

**Gelchromatographische Isolierung
von Chromatinsubstrukturen und ihre
elektronenmikroskopische Darstellung**

Franz-Josef Spira

1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552617_0018

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

GELCHROMATOGRAPHISCHE ISOLIERUNG VON CHROMATINSUBSTRUKTUREN
UND IHRE ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von Franz-Josef Spira

aus Bingen am Rhein

Mainz, 1980



Dekan: Professor Dr. med. H. Leithoff

1. Gutachter: Professor Dr. med. R. K. Zahn

2. Gutachter: Professor Dr. Ing. D. Weinblum

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Februar 1981

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
METHODEN	
I. Zellkernisolierung	5
II. Chromatinextraktion	7
III. Spaltung der Chromatinfasern	8
1. Mechanische Spaltung durch Ultraschall	9
2. Enzymatische Spaltung mit spezifischer DNase	10
IV. Isolierung der Nucleosomen durch Gelchromatographie	10
V. Elektronenmikroskopie	14
ERGEBNISSE	
I. Zellkernisolierung	16
II. Waschen der Zellkerne und Chromatinextraktion	17
III. Verdauung des Chromatins mit DNase	18
IV. Gelchromatographie	18
1. Gelchromatographische Trennung von gequollenem und fixiertem Chromatin	19
2. Fraktionierung des beschallten Chromatins	21
3. Fraktionierung von Chromatin, das mit Mikrokokken-Nuclease partiell abgebaut wurde	23
a. nach milder Nucleaseverdauung	
a.a. Trennung an Sepharose 4 B	23
a.b. Trennung an Sephadex G 200	26
a.c. Trennung an Sephadex G 150	28

b. nach extensiver Nucleaseverdauung	
b.a. Elutionsmittel: Tris-HCl 1 mM, Na-EDTA 2 mM	32
b.b. Elutionsmittel: NaCl 100 mM, Na-Citrat 50 mM	35
b.c. Elutionsmittel: H ₂ O	37
V. Elektronenmikroskopie	
1. Elektronenmikroskopie des beschallten Kernmaterials	41
2. Elektronenmikroskopie des DNase-verdauten Chromatins	43
DISKUSSION	47
ZUSAMMENFASSUNG	54
LITERATURVERZEICHNIS	55

EINLEITUNG

Während die stoffliche Zusammensetzung des Chromatins von Eukaryonten hinreichend bekannt ist -es ist aufgebaut aus DNA und basischen Histonproteinen von etwa gleicher Menge, einer großen Zahl saurer Kernproteine und aus einer geringen Menge RNA-, war deren Organisation auf molekularem Niveau lange Zeit unbekannt. Dies, obwohl man wußte, daß DNA und Protein Chromatinfasern bilden, die dicht gepackt als Chromosomen während der Mitose und locker gefaltet im Interphasechromatin vorliegen (Lewin, 1975).

Eine Vielzahl von Modellen des Chromatinaufbaues wurde aufgrund von Röntgenstrukturanalysen und elektronenmikroskopischer Befunde an Chromatinfasern vorgeschlagen (Solari, 1974). Sie alle gehen von einer vielfach (superhelical) gewundenen DNA-Doppelhelix als Grundgerüst aus, die außen kontinuierlich von Histonen bedeckt ist. Chromatinfasern, die aussehen wie "beads on a string" konnten erstmals 1965 von DuPraw nach milder Trypsinverdauung gezeigt werden. Im gleichen Jahr konnte Wolfe an unbehandelten Präparationen ähnliche Strukturen zeigen.

Diesen Erscheinungen wurde aber wenig Beachtung geschenkt, bis es Olins und Olins (1974) durch Quellung von Interphasezellkernen in stark hypotoner KCl-Lösung gelang, Chromatinfasern mit perlschnurartiger Struktur im Elektronenmikroskop darzustellen: Sphärische Partikel mit einem Durchmesser von 60-80 Å sitzen auf einer Kette und sind verbunden durch dünne Filamente.

Spaltung dieser Chromatinfasern durch Ultraschall (Senior et al., 1975) oder Nucleaseverdauung (Noll, 1974; Burgoyne et al., 1974; Noll, 1974 b; Gottesfeld et al., 1975) lieferte die sich wiederholenden Grundbausteine (repeating subunits), die, im Sucrosegradienten getrennt, als Mono- und Oligomere (Bakayev et al., 1975; Finch et al., 1975) elektronenmikroskopisch dargestellt werden konnten.

Diese "subunits of chromatin" werden auch ν -bodies, Nucleosomen oder Monosomen genannt, entsprechend ihre oligomeren Verbindungen.

Senior et al. (1975) untersuchten monomere Nucleosomen aus beschalltem Chromatin und fanden nach extensiver Pronaseverdauung dieser Partikel überwiegend doppelsträngige DNA-Fragmente mit einer Länge von etwa 710 Å bestehend aus ungefähr 210 Basenpaaren.

Noll (1974) konnte zeigen, daß etwa 85% des Chromatins durch Partialabbau mit Mikrokokken-Nuclease in Chromatin-substrukturen überführt werden kann, und daß diese Monosomen DNA-Fragmente von ca. 200 Basenpaaren enthalten. Aber nicht nur Mikrokokken-Nuclease, sondern auch endogene Nucleasen (Burgoyne et al., 1974) und Nucleasen aus Pankreas (Noll, 1974 b) und Milz (Gottesfeld et al., 1975) erzeugen DNA-Bruchstücke dieser Länge.

Die Rolle basischer Histonproteine beim Aufbau der Chromatinsubstrukturen wurde erstmals von Kornberg (1974) postuliert. Sein Modell beruht auf Beobachtungen von Kornberg und Thomas (1974), wonach basische Histonproteine unter bestimmten Bedingungen ein typisches Aggregationsverhalten zeigen, und die Mischung dieser Aggregate mit DNA das gleiche Röntgenbeugungsmuster produziert wie natives Chromatin selbst.

Demnach besteht jedes Nucleosom aus einem Histon-Octamer als Gerüst, das aufgebaut ist aus einem $(H_3-H_4)_2$ -Tetramer und je zwei Molekülen der weniger lysinreichen Histone H_{2a} und H_{2b} , wobei die argininreichen Histone H_3 und H_4 wahrscheinlich den Kern dieses Gerüstes bilden.

Mit diesem Histongerüst assoziiert sind etwa 200 Basenpaare von DNA, von denen 140 in einer besonders nuclease-resistenten Form (Sollner-Webb und Felsenfeld, 1975) mit dem H_3-H_4 -Kern selbst verbunden sind. Die DNA dürfte dabei an der Außenseite des Proteinkerns in Form einer Superwindung lokalisiert sein und mit den basischen Segmenten des Histonkomplexes in Wechselwirkung treten.

Die apolaren Segmente dieser Histone werden für den Zusammenhalt innerhalb des Proteingerüstes verantwortlich gemacht. (Baldwin et al., 1975).

In Rekonstruktionsexperimenten mit allen vier gereinigten Histonen und DNA konnten Oudet et al. (1975) elektronenmikroskopisch Chromatinkomplexe zeigen, die nativen Chromatinsubstrukturen entsprechen.

Das lysinreiche Histon H₁ bildet mit den übrigen Histon-typen keine Komplexe (Kornberg und Thomas, 1974). Daraus folgerte Kornberg (1974), daß es am Aufbau der Nucleosomen nicht beteiligt ist. Andere Beweise durch Röntgenstrukturanalysen (Baldwin et al., 1975) und elektronenmikroskopische Untersuchungen (Varshavsky und Bakayev, 1975) sprechen ebenfalls dafür.

Man nimmt an, daß H₁ an der Außenseite der Substrukturen gelegen ist und wahrscheinlich für die Querverbindung der Nucleosomen innerhalb der oder zwischen den benachbarten Chromatinketten verantwortlich ist (Baldwin et al., 1975; Lewin, 1975). Es ist im Vergleich zu den übrigen Histonproteinen leicht vom Chromatin abzulösen, und das Chromatin ist nach seiner Entfernung löslich (Lewin, 1975). H₁ könnte mit den etwa 50 Basenpaaren der "non core"-DNA assoziiert sein, denn seine selektive Entfernung macht diesen DNA-Abschnitt besonders nucleaseempfindlich (Whitlock und Simpson, 1976).

Ebenso scheinen die sauren Kernproteine nicht am Aufbau der Nucleosomen beteiligt zu sein, wie die Rekonstruktionsexperimente mit DNA und Histonen zeigen. Sie dürften aber gleichfalls an der Außenseite dieser Substrukturen gelegen sein (Lewin, 1975), wo sie dann als Regulationsfaktoren bei der Genexpression spezifische Strukturen innerhalb der Nucleosomen erkennen müßten (Lacy und Axel, 1975). Dies stimmt überein mit Befunden von Gottesfeld et al. (1975), die fanden, daß transcriptionell inaktives Chromatin nucleaseresistente Strukturen als DNA-Histonkomplexe (Nucleosomen) enthält, während nucleaseresistente Strukturen in transcriptionell aktivem Chromatin aus Komplexen von DNA, RNA, Histonen und Nicht-Histonproteinen bestehen.

Der Durchmesser der Nucleosomen wird bei Olins und Olins (1974) mit etwa 70 Å, bei Oudet et al. (1975) dagegen mit 130 Å angegeben. Diese Differenz dürfte einmal auf einem unterschiedlichen Hydratationsgrad der Nucleo-Histon-Komplexe beruhen, bedingt durch das Vorgehen bei ihrer Fixation, zum anderen auf unterschiedlichen Kontrastierungsmethoden (Varshavsky und Bakayev, 1975 b; Lewin, 1975). Ihr Molekulargewicht wird mit 300.000 angegeben (Senior et al., 1975).

Ziel dieser Arbeit ist die Isolierung solcher Chromatin-substrukturen durch Gelchromatographie. Bisher wurden Nucleosomen mit Hilfe der Gradientenzentrifugation gewonnen, ein Verfahren, bei dem die unterschiedliche Dichte der Chromatinstrukturen für ihre Trennung verantwortlich ist. Hier sollte versucht werden, das nach morphologischen Kriterien diskriminierende Verfahren der Gelchromatographie anzuwenden, ein Verfahren, das Moleküle nach ihrer Größe trennt.

METHODEN

I. Zellkernisolierung

Interphasezellkerne werden aus Mäuseleber gewonnen.

Die Zellen werden dazu im Homogenisator aufgeschlossen durch Scherkräfte im capillären Spalt, das Homogenat wird durch Zentrifugation fraktioniert.

Die Sedimentationsgeschwindigkeit der subzellulären Strukturen im Schwerfeld der Zentrifuge hängt u.a. von der Teilchengröße und der Dichtedifferenz zwischen Partikel und Homogenisiermedium ab. Die unterschiedliche Größe der intrazellulären Organellen wird bei der Differentialzentrifugation, ihre -wenn auch geringe- unterschiedliche Dichte bei der Dichtegradientenzentrifugation genutzt. Die Sedimentation wird bestimmt durch das Produkt aus Zeit und Zentrifugalbeschleunigung ($g \times \text{min}$).

Materialien: Beckman Ultrazentrifuge mit SW 40 Ti-Rotor
Kühlzentrifuge: Sorvall RC 2B mit HB 4 Rotor
handgetriebener Glashomogenisator nach Dounce
mit L- und S-Stempel
Gradientenmischpumpe
Versuchstiere: Swiss mice, white strain

Alle Chemikalien sind p.a. Qualität. Alle Lösungen werden durch $0,45 \mu$ Glasfilter der Firma Millipore GmbH, Neu-Isenburg, filtriert.

Lösungen: 1. Homogenisiermedium = Lösung 1

Sucrose	0,32	M	
MgCl ₂	1	mM	
KH ₂ PO ₄	0,4	mM	
K ₂ HPO ₄	0,4	mM	pH 6,7

2. Lösung 2

Tris-HCl	50	mM	
Mercaptoäthanol	5	mM	pH 7,6

3. Rohrzuckerlösungen für die Dichtegradientenzentrifugation

a. Sucrose	2,39	M	
MgCl ₂	1	mM	
K ₂ HPO ₄	3,5	mM	
ATP	7	mM	pH 6,7
b. Sucrose	1,50	M	
MgCl ₂	1	mM	
K ₂ HPO ₄	3,5	mM	
ATP	7	mM	pH 6,7
c. Sucrose	2,0	M	
MgCl ₂	1	mM	
K ₂ HPO ₄	3,5	mM	
ATP	7	mM	pH 6,7

Vorgehen bei der Kernisolierung

Vor Versuchsbeginn läßt man die Mäuse bis zu 24 Std. hungern, um den Glykogengehalt der Leberzellen zu reduzieren.

Die Tiere werden durch Dekapitieren getötet. Das Gewebe wird schnell entnommen, gewogen und in Lsg. 1 gewaschen und gekühlt. Alle folgenden Operationen werden ebenfalls im Eisbad ausgeführt.

Das Gewebe wird mit einer Schere fein zerstückelt, dann werden ca. 3 Vol. der Lsg. 1 zugesetzt (McGuire and O'Malley, 1968). Dieses Material wird homogenisiert, indem man es zunächst vorsichtig, dann etwas kräftiger mit dem L-Stempel behandelt (10-20 Schübe), bis eine homogene Suspension entsteht. Diese wird durch zwei Lagen Filtertuch (Perlon endlos, F Sch A 9006 der Firma Filtra, Neubeekum/Westf.) filtriert und anschließend mit gleichem Volumen Lsg. 2 (= 4faches Vol.) verdünnt (McGuire and O'Malley, 1968) und nochmals mit dem L-Stempel homogenisiert.

Das Homogenat wird mit 600 x g -entsprechend 2000 rpm mit HB 4 Rotor- 20 Min. lang bei 0°C in der Sorvall RC 2B-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig dekantiert, und die Innenseiten der Zentrifugenröhren werden mit nicht faserndem Papier ausgewischt. Das Sediment eines Organs wird in 25 ml Lsg. 1 resuspendiert und mit jeweils 5-10 Schüben mit dem L- und S-Stempel homogenisiert und nun bei 800 x g für 10 Min. bei 0°C abzentrifugiert. Dieser Reinigungsschritt wird noch dreimal wiederholt. (McGuire and O'Malley, 1968).

Als letzter Reinigungsschritt folgt die Dichtegradientenzentrifugation: die Sucrosegradienten werden mit Hilfe einer Gradientenmischpumpe aus den Lösungen 3.b und c so gemischt, daß ein kontinuierlich ansteigender Gradient von 1,50 M Sucrose am Meniskus bis 2,0 M am Boden der Zentrifugenröhre entsteht. Diesen Gradienten werden das in Lsg. 1 homogenisierte Sediment aus der letzten Differentialzentrifugation vorsichtig überschichtet. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgt bei 50.000 x g für 60 Min. bei 0°C in einer Beckman-Ultrazentrifuge mit SW 40 Ti-Rotor.

Auf eine andere Art (nach McGuire and O'Malley, 1968.) wird das Sediment aus der letzten Differentialzentrifugation in 1,8 ml Lsg. 1 und 10 ml der Lösung 3.a resuspendiert und ebenfalls mit dem L- und S-Stempel behandelt. Dieses Homogenat wird ebenso mit 50.000 x g für 90 Min. bei 0°C ultrazentrifugiert.

Der Überstand wird bei beiden Methoden verworfen, das Kernpellet gesammelt und weiterverarbeitet.

II. Chromatinextraktion

Die bei der Dichtegradientenzentrifugation im Sediment erscheinenden Zellkerne werden zunächst gewaschen. Dabei werden Nicht-Histonproteine aus den Kernen herausgelöst, während basische Histonproteine im Überstand nicht nach-

weisbar sind (Olins and Olins, 1974).

An das Waschen der Kerne schließt sich ihre Quellung in stark hypotoner Lösung an, wobei das Chromatin durch Platzen der Kerne infolge osmotischer Druckdifferenz freigesetzt wird.

Zum Waschen der Kerne werden benötigt:

CKM-Puffer:	Sucrose	0,25 M	
	Na-Cacodylat	50 mM	
	KCl	25 mM	
	MgCl ₂	5 mM	pH 7,6
und	KCl	0,2 M	

Als Quellungslösungen dienen:

	KCl	1 mM	
	für die Ultraschallbehandlung		
und	Tris-HCl	1 mM	pH 7,6
	für die DNase-Behandlung des Chromatins.		

Zum Waschen der Kerne wird das Sediment aus dem Dichtegradienten in 30 ml CKM-Puffer suspendiert, vorsichtig mit dem L-Stempel homogenisiert und für 10 Min. mit 800 x g abzentrifugiert. Der gleiche Waschvorgang wird noch einmal in CKM-Puffer und anschließend einmal in 0,2 M KCl-Lösung durchgeführt (Olins and Olins, 1974).

Für die Ultraschallbehandlung wird das Kernsediment in 1 mM KCl-Lösung (Senior et al., 1975), für die DNase-Einwirkung in 1 mM Tris-HCl (Bakayev et al., 1975), gequollen. Das Platzen der Kerne wird durch scharfes Homogenisieren mit dem S-Stempel unterstützt. Die Quellungszeit beträgt in beiden Fällen 30-60 Minuten; dabei wird das Chromatiningel im Eisbad kühl gehalten (Senior et al., 1975).

III. Spaltung der Chromatinfasern

Bei der Quellung der Kerne in Wasser entstehen die im Elektronenmikroskop perlkettenartig strukturierten Chromatinfasern (Olins and Olins, 1974).

Einzelne Nucleosomen werden erzeugt, indem man den DNA-Doppelstrang zwischen benachbarten Nucleosomen spaltet. Dies geschieht mechanisch mittels Ultraschall (Senior et al., 1975) oder enzymatisch durch Einwirkung spezifischer DNase auf das gequollene Chromatin (Noll, 1974).

1. Mechanische Spaltung durch Ultraschall

Die vom Schallkopf eines Ultraschallgebers ausgehenden Längsschwingungen erzeugen in Wasser Druckschwankungen, die sich als Longitudinalwellen ausbreiten. Die Materieteilchen schwingen also mit der Anregungsfrequenz in Ausbreitungsrichtung um ihre Ruhelage, so daß Zonen großer und kleiner Teilchendichte entstehen.

In diesen Kompressions- und Dekompressionszonen sollen die primären Chromatinfasern, die bei der Quellung der Kerne in Wasser freigesetzt werden, zerreißen (Senior et al., 1975).

Man benötigt zu dieser Spaltung:

ein Ultraschallgerät (Sonifier B 12, Branson Sonic Power Company, Danburg)

und als Lösung: Formaldehyd 1%
 KCl 1 mM
 Tris-HCl 5 mM pH 7,6

Das gequollene Chromatin wird durch Zusatz von gepuffertem Formaldehyd (pH 7,6) bis zu einer Endkonzentration von 1% für ca. 18 Std. unter Kühlung im Eisbad fixiert.

Formaldehyd dient einer milden Stabilisierung des Proteingerüsts der Nucleosomen. Dies geschieht hauptsächlich über die Bildung von Methylenbrücken zwischen benachbarten Seitengruppen. Auf diese Weise soll der Histonkern vor Konformationsänderungen während der weiteren Aufarbeitung, besonders bei der Ultraschallung und der elektronenmikroskopischen Darstellung, geschützt werden.

Nach der Fixation wird das Chromatin für 2 Std. mit 27.000 x g abzentrifugiert und in 5 ml der o.a. 1%igen Formaldehydlösung resuspendiert.

Die Beschallung erfolgt unter Kühlung im Eisbad bei maximaler Schallintensität (Senior et al., 1975). Die Dauer der Beschallung beträgt 10 mal je 1 Minute mit jeweils 1 Minute Pause dazwischen zur Abkühlung der Lösung.

2. Enzymatische Spaltung mit spezifischer DNase

Desoxyribonucleasen sind Enzyme, die durch hydrolytische Spaltung der 3'- bzw. 5'-Phosphor-Ester-Bindung hochmolekulare Nukleinsäuren in Mono- bzw. Oligonucleotide abbauen. Noll (1974) fand, daß Mikrokokken-Nuclease speziell die DNA-Kette zwischen benachbarten Nucleosomen angreift, daß die mit dem Histonkern assoziierte DNA aber weitgehend unberührt bleibt.

Verwendet wird:

Mikrokokken-Nuclease von Schwarz/Mann (12.000 E/mg)

Als Lösungen werden benötigt:

- a. CaCl_2 100 mM pH 7,6
- b. Na-EDTA 100 mM pH 7,6
- c. gepufferter Formaldehyd (10%)

Vorgehen

Dem in 1 mM Tris-HCl gequollenen Chromatin werden CaCl_2 -Lösung (Endkonzentration 1 mM) und Mikrokokken-Nuclease (20-50 E/ml) zugesetzt und 10-15 Min. bei 37°C inkubiert. Die DNase-Aktivität wird durch EDTA-Zusatz (Endkonzentration 2 mM) und Kühlung der Lösung im Eisbad gestoppt. Die Fixierung erfolgt in 1%iger Formaldehydlösung, hergestellt durch Zusatz von gepuffertem 10%igem Formaldehyd. (Bakayev et al., 1975).

IV. Isolierung der Nucleosomen durch Gelchromatographie

Die durch Partialabbau der Chromatinfasern freiwerdenden Chromatinsubstrukturen werden durch Gelchromatographie getrennt.

Prinzip

Bei diesem Trennverfahren ist die Molekülgröße bzw. das Molekulargewicht für den Trenneffekt verantwortlich. Trennmedium sind poröse Gelpartikel, die aus quervernetzten Kohlehydratketten aufgebaut sind und je nach Vernetzungsgrad unterschiedlich große Poren aufweisen, deren Größe als Trennparameter dient.

Diese Gelpartikel sind in einer Säule zum eigentlichen Trennbett aufgeschichtet, dessen Gesamtvolumen V_T sich aus dem Volumen der Gelmatrix V_M , dem Volumen außerhalb der Gelpartikel V_A (Ausschlußvolumen) und der Summe der Porenvolumina (Inneres Volumen) V_I zusammensetzt:

$$V_T = V_M + V_I + V_A$$

Die in einem Substanzgemisch gelösten Moleküle durchfließen das äußere Volumen des Gelbettes. Dabei verbleiben die Moleküle, die aufgrund ihrer Größe nicht in das innere Volumen diffundieren können, im Ausschlußvolumen. Für Moleküle aber, die aufgrund ihres Volumens in die Poren diffundieren können, stellt sich bei genügend kleiner Durchflußrate in jeder Höhe der Säule zwischen der inneren und äußeren Phase ein Diffusionsgleichgewicht ein, so daß diese Moleküle neben dem Ausschlußvolumen auch einen Teil des inneren Volumens V_{IX} durchwandern. Es gilt:

$$V_{IX} = k V_I \quad \text{mit} \quad 0 \leq k \leq 1$$

Bezogen auf die Gleichgewichtseinstellung zwischen der äußeren und den einzelnen Poren der inneren Phase kann k zwar nur die Werte Null oder Eins annehmen, da es entweder zur Gleichgewichtseinstellung mit gleichen Konzentrationen in beiden Phasen kommt oder nicht. Bezieht man dagegen den k -Wert auf das gesamte innere Volumen, so entspricht er einem Verteilungskoeffizienten:

$$k = C_{VI} / C_{VA}$$

C_{VI} = Konzentration im inneren Volumen
 C_{VA} = Konzentration im Ausschlußvolumen

Die Konstante k kann dann Werte zwischen Null und Eins annehmen.

Der k-Wert ist eine Stoffkonstante, die -unter der Voraussetzung, daß das Molekulargewicht der Raumerfüllung eines Moleküls proportional ist- allein vom Molekulargewicht abhängig ist, es sei denn, es kommt zu Wechselwirkungen zwischen der Gelmatrix und den zu trennenden Molekülen. (Determann, H., 1967).

Berechnung des k_d -Wertes

Das Volumen, das eine Substanz in der Säule durchwandert, setzt sich zusammen aus dem Ausschlußvolumen V_A sowie einem gewissen Anteil des inneren Volumens V_{Ix} .

Es gilt:

$$\begin{aligned} \text{Elutionsvolumen } V_e &= V_A + V_{Ix} \\ &= V_A + k_d V_I \end{aligned}$$

für k_d folgt:

$$k_d = \frac{V_e - V_A}{V_I}$$

V_I läßt sich nur bei den Dextrangelen von Sephadex aus dem Trockengewicht und aus dem Wasseraufnahmevermögen mit einiger Sicherheit bestimmen. Bei anderen Gelen ist die Bestimmung von V_I unsicher oder überhaupt nicht möglich. Für eine allgemeine Anwendung ist der von Laurent und Killander definierte k_{av} -Wert besser geeignet:

$$k_{av} = \frac{V_e - V_A}{V_T - V_A}$$

Materialien

1. Trennmedien

- | | |
|-------------------|----------------------------|
| a. Sepharose 4 B | $M_{lim} = 20 \times 10^6$ |
| b. Sephadex G 200 | $M_{lim} = 8 \times 10^5$ |
| c. Sephadex G 150 | $M_{lim} = 4 \times 10^5$ |

(M_{lim} = Molekulargewichtsausschlußgrenze für globuläre Moleküle)

Hersteller dieser Gele: Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala/Schweden.

2. Elutionslösungen

- a. Formaldehyd 1%
Tris-HCl 5 mM
KCl 1 mM pH 7,6
- b. Tris-HCl 1 mM
Na-EDTA 2 mM pH 7,6
- c. NaCl 100 mM
Na-Citrat 50 mM pH 7,6
- d. H₂O

3. Glassäulen mit Glasfritte und capillärem Auslauf

4. Fraktionssammler: LKB-Ultro-Rac 7000 mit LKB UV-Detektor Uvicord II und automatischem Schreiber

Vorgehen

Trockenes Sephadex wird in Aqua dest. nach Vorschrift gequollen, die Säule mit dem gequollenen Gel beschickt und mit dem 3fachen Säulenvolumen des entsprechenden Elutionspuffers äquilibriert. Nach abgeschlossener Äquilibration wird die restliche Elutionslösung über dem Gelbett einsickern lassen, der capilläre Auslauf geschlossen, sobald der Meniskus das Gelbett erreicht hat, und die Höhe gemessen.

Die Analysenlösung wird mit einer Glaspipette vorsichtig aufgetragen ohne die Oberfläche des Gels aufzuwirbeln. Gleichzeitig wird der capilläre Auslauf geöffnet. Nach Absinken des Flüssigkeitsspiegels auf die Packungsoberfläche wird mit etwa gleichem Volumen Elutionslösung noch zweimal auf die gleiche Weise überschichtet, erst dann wird die Säule mit Elutionspuffer aufgefüllt und an den Vorratsbehälter angeschlossen.

Das Eluat wird in kleinen Fraktionen gesammelt, und die Transmission in Prozent des Ausgangswertes bei $\lambda = 254 \text{ nm}$ für die einzelnen Fraktionen aufgezeichnet. Das Elutionsvolumen V_e wird durch Auswiegen der einzelnen Fraktionen bestimmt. Die Regenerierung der Säule erfolgt mit 4%iger SDS-Lösung.

Vor der gelchromatographischen Auftrennung wird das zu trennende Material nochmals zentrifugiert: das mit Ultraschall behandelte Kernmaterial mit $1.000 \times g$ für 10 Min. zur Entfernung der lichtoptisch nachweisbaren Strukturen,

das mit Mikrokokken-Nuclease verdaute Chromatin mit 10.000 x g für 10 Min. (Bakayev et al., 1975) zur Beseitigung der Ausfällungen, die sich während der Nuclease-verdauung gebildet haben.

Es werden folgende Substanzgemische gelchromatographisch aufgetrennt:

1. das gequollene, fixierte und beschallte Chromatin wird getrennt an Sepharose 4 B und eluiert mit Formaldehyd 1%, Tris-HCl 5 mM, KCl 1 mM, pH 7,6
2. das gequollene und mit Mikrokokken-Nuclease verdaute Chromatin wird
 - a. nach milder Verdauung getrennt an Sepharose 4 B, Sephadex G 200 und G 150 und eluiert mit Tris-HCl 1 mM, Na-EDTA 2 mM, pH 7,6
 - b. nach extensiver Verdauung getrennt an Sepharose 4 B und eluiert mit
 - b.a. Tris-HCl 1 mM
Na-EDTA 2 mM pH 7,6
 - b.b. NaCl 100 mM
Na-Citrat 50 mM pH 7,6
 - b.c. H₂O
3. das gequollene und fixierte Chromatin im Überstand nach Zentrifugation mit 10.000 x g für 10 Min. wird getrennt an Sepharose 4 B und eluiert mit Tris-HCl 1 mM, Na-EDTA 2 mM, pH 7,6.

V. Elektronenmikroskopie

Die isolierten Chromatinfractionen werden elektronenmikroskopisch untersucht. Beurteilt werden Form, Größe und Struktur der Nucleoproteinkomplexe.

Elektronenmikroskopisch dargestellt werden das gequollene, fixierte und beschallte Chromatin und das Chromatin nach Partialabbau mit Mikrokokken-Nuclease.

Gelchromatographisch gereinigtes Chromatin, gelöst im jeweiligen Elutionspuffer, wird auf mit aktivierter Kohle beschichtete Kupfernetzchen aufgetropft und bis zu 10 Min. absorbieren lassen. Die Flüssigkeit wird mit Hilfe eines Filterstreifens seitlich abgesaugt und das Netz trocken gelassen. Die Kontrastierung erfolgt durch Phosphowolframsäure oder durch Schwermetallbedampfung. Die Bilder werden im Hell- und Dunkelfeldverfahren dargestellt.

1. PTA-Kontrastierung

Phosphowolframsäure (PTA) 4% in 95%igem Äthanol (Mischungsverhältnis 3:7) wird nach Adsorption und Antrocknen der Proben auf die Netzchen aufgetropft und für ungefähr 3 Min. einwirken lassen. Dann wird mit 95%igem Äthanol gespült und die Netzchen werden luftgetrocknet.

2. Schwermetallbedampfung

Nach Auftropfen der Probe und Adsorption wird das Netzchen in H_2O gespült und Äthanol-getrocknet. Die Pt-Bedampfung erfolgt durch Kegelbeschattung, wobei unter gleichmäßigem Drehen des Präparates Platin bei einem Winkel von 7° schräg aufgedampft wird.

ERGEBNISSE

I. Zellkernisolierung

Die Überprüfung der Kernfraktionen erfolgt im Lichtmikroskop. Es wird die morphologische Integrität der Kerne nach jedem Reinigungsschritt und abschließend die Kontamination der Kernfraktionen mit lichtoptisch nachweisbaren Zytoplasmastrukturen kontrolliert.

Die Untersuchung wird an einem mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Ausstrichpräparat aus resuspendiertem und homogenisiertem Kernsediment bei 100-400facher Vergrößerung durchgeführt.

Wichtig ist ein genau dosierter Kraftaufwand beim Homogenisieren, der individuell zu erproben ist. Ein zu scharfes Vorgehen führt zu verminderter Resistenz durch mechanische Schädigung der Kernmembranen und damit zum vorzeitigen Aufbrechen der Kerne mit Ausströmen des Chromatins. Ein zu vorsichtiges und langsames Homogenisieren dagegen läßt eine große Anzahl von Zellen intakt, und es bleiben Membranen des endoplasmatischen Retikulums an den Kernmembranen haften.

Die Zellkerne erscheinen sowohl bei der Differential- als auch bei der Dichtegradientenzentrifugation im Sediment. Im Überstand sind nur vereinzelt Zellkerne nachweisbar. Bei den sich wiederholenden Reinigungsschritten durch Differentialzentrifugation findet sich eine zunehmende Aufklärung des Überstandes und eine deutliche Minderung der zytoplasmatischen Verunreinigungen im Sediment. Die Kerne liegen z.T. vereinzelt, z.T. aber auch locker in Haufen zusammen, verbunden durch Zytoplasma. Im Sediment finden sich außerdem noch relativ viele Erythrozyten. Läßt man $MgCl_2$ im Homogenisiermedium weg oder ersetzt es durch Na-EDTA, so kommt es zu einer massiven Agglomeration der Zellkerne einerseits, andererseits zum massenhaften Auftreten von intakten Zellen im Homogenat.

Die in der Sucroslösung mit homogener Dichte ultrazentri-fugierten Kerne enthalten noch zytoplasmatische Verunrei-nigungen, während die im kontinuierlich ansteigenden Gradien-ten gereinigten Kerne frei von lichtoptisch nachweisbaren Zytoplasmabestandteilen sind.

Die Kerne sind jedoch z.T. gering deformiert und erscheinen etwas geschrumpft, was auch an dem gewellten Verlauf der Kernmembranen erkennbar ist und auf Wasserverlust in der stark hypertonen Sucroslösung zurückzuführen sein dürfte.

II. Waschen der Zellkerne und Chromatinextraktion

Das Verhalten der Kerne beim Waschen und Quellen in stark hypotoner Lösung wird ebenfalls im Lichtmikroskop kontrol-liert. Färbung und Vergrößerung wie oben angegeben.

Beim Einbringen des Kernsediments aus der stark hypertonen Rohrzuckerlösung des Dichtegradienten in die isotonen Wasch-lösungen kommt es -vermutlich durch verminderte osmotische Resistenz infolge Schädigung der Kernmembranen- zum Platzen eines Teils der Kerne mit Auslaufen des Chromatins.

Das Suspendieren der Kerne in den stark hypotonen Quellungs-lösungen führt dagegen zum Platzen fast aller Kerne. Dabei verteilt sich das Chromatin gleichmäßig in der Lösung und ist lichtoptisch als schwach gefärbte feinste Granula im Untergrund zu sehen. Vereinzelt sind aber noch einige mor-phologisch unversehrt aussehende, zumeist kleine Kerne sichtbar. Diese sind auch nach längerer Quellungszeit und bei stärkerer Verdünnung der Chromatinlösung nicht quell-bar, sondern werden erst durch scharfes Homogenisieren fragmentiert. Daneben finden sich in der Chromatinlösung stark anfärbbare Agglomerate von bis zu 2-3facher Kerngröße in den unterschiedlichsten Formen, deren Bedeutung unklar ist.

III. Verdauung des Chromatins mit DNase

Auffällig bei der Nucleaséeinwirkung auf das Chromatin ist eine zunehmende Trübung der Lösung, die schon während der Erwärmung auf 37°C sichtbar wird, und die in eine relativ grobflockige, weißliche Ausfällung am Ende der Inkubationszeit mündet.

IV. Gelchromatographie

Ziel der Gelchromatographie ist es, isolierte Chromatin-substrukturen zu gewinnen, um sie einmal im Elektronenmikroskop sichtbar zu machen, zum anderen, um sie als Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen zur Verfügung zu haben. Ersteres erfordert Befreiung der Monosomenfraktion von elektronendichten Verunreinigungen, letzteres vor allem chemische Reinheit.

Es werden Trennmedien verwendet, deren Molekulargewichtsausschlußgrenzen für globuläre Proteine größer sind als das Molekulargewicht der ebenfalls globulär strukturierten Nucleosomen, das mit 300.000 (Senior et al., 1975) angegeben wird. Zur Kennzeichnung des Chromatingehaltes der einzelnen Fraktionen wird deren Transmissionsgrad in Prozent bei $\lambda = 254 \text{ nm}$ automatisch registriert. Die Elutionsvolumina werden bestimmt und die k_{av} - bzw. k_d -Werte der UV-absorbierenden Fraktionen nach den o.a. Vorschriften errechnet.

Das totale Säulenvolumen läßt sich aus dem Durchmesser der Säule und der Höhe der Gelpackung errechnen. Das äußere und für die Sephadextypen auch das innere Volumen lassen sich dann aus dem Säulenvolumen und den vom Hersteller gemachten Angaben über die Volumenverhältnisse ($V_T:V_A:V_I$) bestimmen.

Gelchromatographisch fraktioniert wird gequollenes Chromatin, das

1. unbehandelt bleibt
2. mit Ultraschall behandelt wird
3. mit Mikrokokken-Nuclease partiell abgebaut wird.

1. Gelchromatographische Trennung von gequollenem und fixiertem Chromatin

Das in Tris-HCl 1 mM gequollene Chromatin wird 10 Min. mit 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird unbehandelt an Sepharose 4 B fraktioniert. Elutionsmittel sind Tris-HCl 1 mM, Na-EDTA 2 mM, pH 7,6. Das Probevolumen beträgt jeweils 4% von V_T , die Durchflußrate liegt zwischen 37,8 und 40,8 ml/Std.

Das Elutionsdiagramm des unverdauten Überstandes (Abb. 1) zeigt ein Maximum bei $k_{av} = 0$ und eine Talbildung bei $k_{av} = 0,92$. Das Tal ist durch fehlendes EDTA in der aufgetragenen Probelösung bedingt (kein Na-EDTA-Zusatz zur Nucleaseinaktivierung), während EDTA im Elutionspuffer enthalten ist.

Tab. 1

Elutionsvolumina und k_{av} -Werte UV-absorbierender Fraktionen von unverdaulichem Chromatin, getrennt an Sepharose 4 B

Nr. der Fraktion	V_e (ml)	k_{av}
7	23,8	- 0,02
8	27,2	0,04
9	30,6	0,10
10	34,0	0,16
11	37,4	0,22
.		
.		
21	71,4	0,87
22	74,8	0,93
23	78,2	1,00
24	81,6	1,06
25	85,0	1,12
26	88,4	1,18

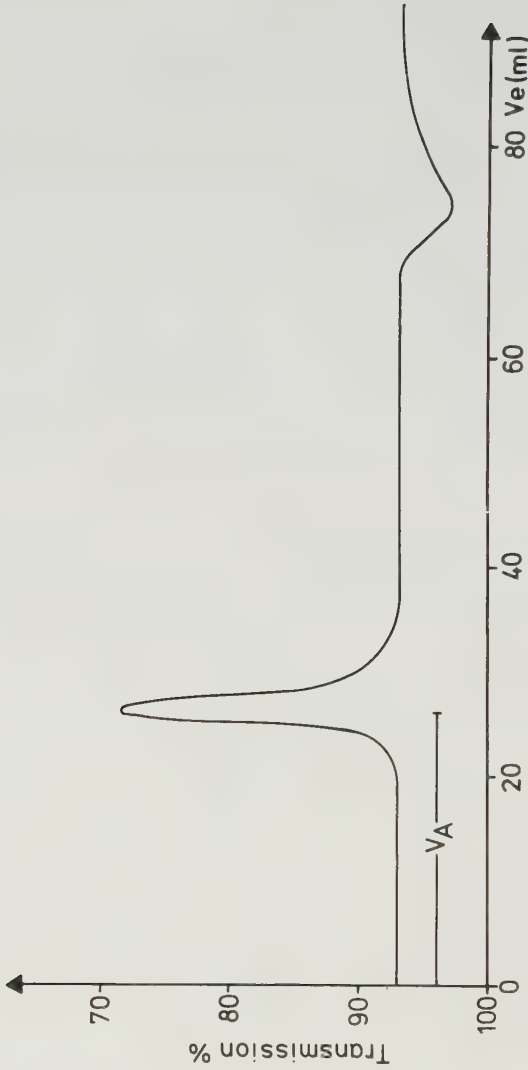


Abb. 1

Fraktionierung von gequollenen und fixiertem Chromatin an Sepharose 4 B.

Gelbett: 2 x 25,0 cm = 78,5 ml. Eluant: Tris-HCl 1 mM, Na-EDTA 2 mM, pH 7,6.

Probevolumen: 3,0 ml. Durchflußrate: 40,8 ml/Std.

2. Fraktionierung des beschallten Chromatins

Das Sediment des in 1 mM KCl gequollenen und in 1%igem Formaldehyd fixierten Chromatins nach Zentrifugation mit 27.000 x g für 120 Min. wird nach Resuspension in 5 ml der gleichen Lösung mit Ultraschallwellen behandelt. Anschließend wird es zur Beseitigung lichtoptisch nachweisbarer Kerntrümmer nochmals zentrifugiert und dann an Sepharose 4 B fraktioniert.

Die Elutionslösung enthält Formaldehyd 1%, KCl 1 mM und Tris-HCl 5 mM, pH 7,6. Die Durchflußrate beträgt 20,7 bis 27,7 ml/Std., das Volumen der aufgetragenen Probe 3-6% des totalen Säulenvolumens.

Wie die Abb. 2 zeigt, liefert die Auftrennung des beschallten Kernmaterials an Sepharose 4 B einen Peak mit Maximum bei $k_{av} = 0$. Alles DNA-haltige Material wandert also im Ausschlußvolumen und hat demzufolge für globuläre Moleküle ein Molekulargewicht von 20×10^6 und größer, für lineare Moleküle liegt es im Bereich von 3×10^6 . Die Kurve ist im Gegensatz zum Elutionsprofil des unbehandelten Chromatins rechtsschief.

Tab.2

Elutionsvolumina und k_{av} -Werte UV-absorbierender Fraktionen von beschalltem Chromatin, getrennt an Sepharose 4 B

Nr. der Fraktion	V_e (ml)	k_{av}
18	27,90	- 0,06
19	29,45	- 0,04
20	31,00	- 0,02
21	32,55	0,01
22	34,10	0,03
23	35,65	0,05
24	37,20	0,08
25	38,75	0,10
26	40,30	0,12
27	41,85	0,15
28	43,40	0,17
29	44,95	0,19

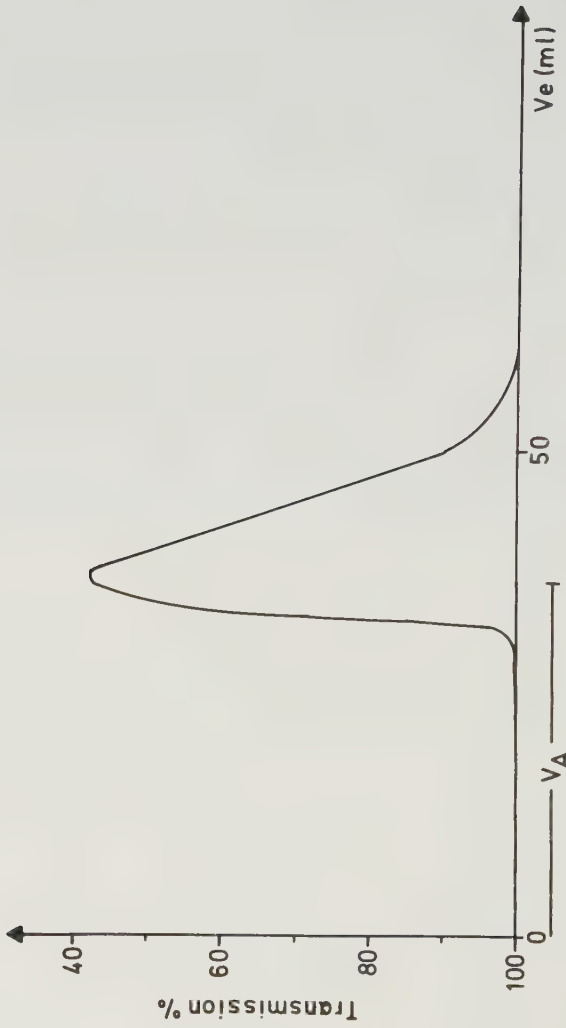


Abb. 2 Fraktionierung von beschalltem Chromatin an Sepharose 4 B.

Gelbett: 1,25 x 81,5 cm = 100 ml. Eluant: Formaldehyd 1%, KCl 1 mM,

Tris-HCl 5 mM, pH 7,6. Probevolumen: 3,0 ml. Durchflußrate: 20,7 ml/Std.

3. Fraktionierung von Chromatin, das mit Mikrokokken-Nuclease partiell abgebaut wurde

a. nach milder Nucleaseverdauung

Das in 1 mM Tris-HCl gequollene Chromatin wird 10 Min. bei 37°C Mikrokokken-Nuclease ausgesetzt (20 E/ml) und nach Enzyminaktivierung, Fixierung und Abzentrifugation des Niederschlages an Sepharose 4 B und an den Sephadex-typen G 200 und G 150 fraktioniert.

Elutionslösung ist Tris-HCl 1 mM, Na-EDTA 2 mM, pH 7,6. Die Durchflußrate beträgt bei den drei Geltypen zwischen 18,5 und 28,1 ml/Std., das aufgetragene Probevolumen zwischen 3 und 4% des jeweiligen Säulenvolumens.

Während unbehandeltes oder beschalltes Chromatin nur einen Peak bei $k_{av} = 0$ liefert, zeigt die Fraktionierung von milde mit Nuclease verdautem Chromatin bei allen verwendeten Trennmedien zwei Absorptionsmaxima.

a.a. Trennung an Sepharose 4 B

Die Trennung an Sepharose 4 B liefert jeweils bei $k_{av} = 0$ und $k_{av} = 0,63$ einen symmetrischen Peak. Der zweite, verzögert eluierte Peak geht in ein Tal über, d.h. in eine Senkung unter die Nulllinie (s. Abb. 3). Dies tritt auf, obwohl der Probe EDTA (Endkonzentration 2 mM) zur Inaktivierung der Nuclease zugesetzt wurde. Das Tal erscheint aber bei einem k_{av} -Wert, der dem Tal des unbehandelten Chromatins (ohne EDTA-Zusatz) entspricht (s. Tab. 3).

Die Kurvenbasis der verzögert eluierten Chromatinfraktion ist gegenüber der im Ausschlußvolumen wandernden verbreitert. Das Separationsvolumen (das Volumen, das die beiden Fraktionen voneinander trennt) beträgt fast die Hälfte des Säulenvolumens (74 ml) (s. Abb. 3).

Tab. 3

Elutionsvolumina und k_{av} -Werte UV-absorbierender Fraktionen von milde mit Nuclease verdautem Chromatin, getrennt an Sepharose 4 B

Nr. der Fraktion	V_e (ml)	k_{av}
14	45,47	- 0,07
15	48,77	- 0,04
16	52,01	- 0,01
17	55,24	0,02
18	58,48	0,04
.		
.		
34	110,45	0,50
35	113,75	0,53
36	116,99	0,56
37	120,22	0,59
38	123,46	0,62
39	126,68	0,64
40	129,88	0,67
41	133,19	0,70
42	136,44	0,73
43	139,68	0,76
44	142,93	0,79
45	146,24	0,82
46	149,49	0,85
47	152,74	0,87
48	155,99	0,90
49	159,23	0,93
50	162,47	0,96
51	165,76	0,99
52	168,97	1,02
53	172,17	1,05
54	175,37	1,07

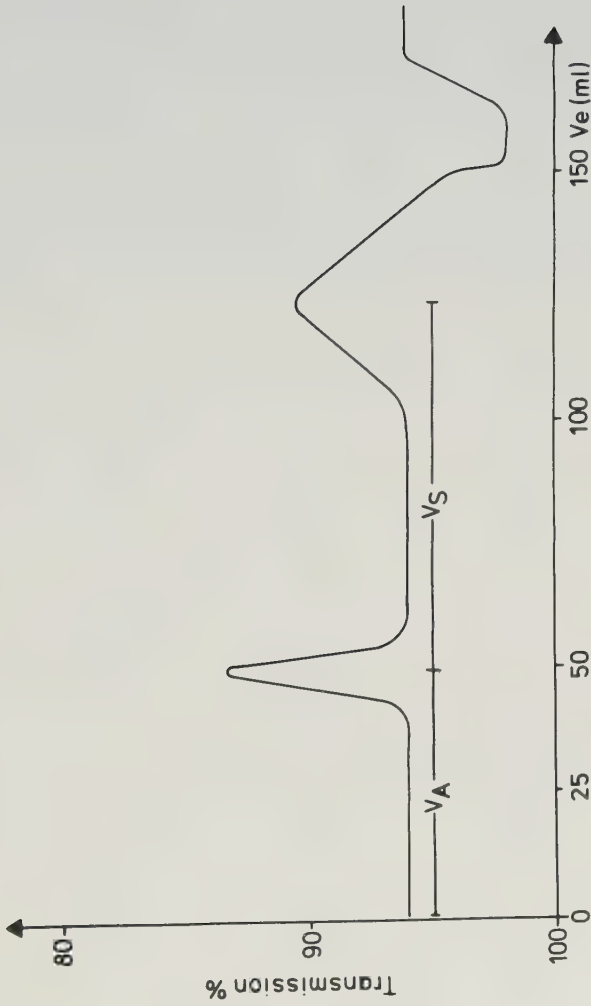


Abb. 3 Fraktionierung von Chromatin an Sepharose 4 B nach milder Nuclease -
Verdaunung. Gelbett: 3,02 x 23,3 cm = 166,9 ml. Probevolumen: 5,0 ml.
Eluant: Tris-HCl 1 mM, Na-EDTA 2 mM, pH 7,6. Durchflußrate: 26,5 ml/Std.

a.b. Trennung an Sephadex G 200

Abb. 4 zeigt den gleichen Trennvorgang an Sephadex G 200. Aufgetragen ist das gleiche Material wie bei Sepharose 4 B. Hier liegt jedoch der erste Peak bei $k_{av} = 0,1$, der zweite Peak bei $k_{av} = 0,93$, ebenfalls gefolgt von einem Tal, das hier jedoch erst im Bereich von $k_{av} = 1,1$ erscheint.

Tab. 4

Elutionsvolumina, k_{av} - und k_d -Werte UV-absorbierender Fraktionen von milde mit Nuclease verdautem Chromatin, getrennt an Sephadex G 200

Nr. der Fraktion	V_e (ml)	k_{av}	k_d
8	26,23	0,03	0,03
9	29,54	0,09	0,09
10	32,73	0,14	0,15
11	35,90	0,20	0,21
.			
.			
21	68,16	0,76	0,80
22	71,34	0,82	0,86
23	74,52	0,87	0,91
24	77,71	0,93	0,97
25	80,89	0,98	1,03
26	84,06	1,04	1,09
27	87,25	1,09	1,15
28	90,44	1,15	1,21
29	93,64	1,20	1,26
30	96,84	1,26	1,32

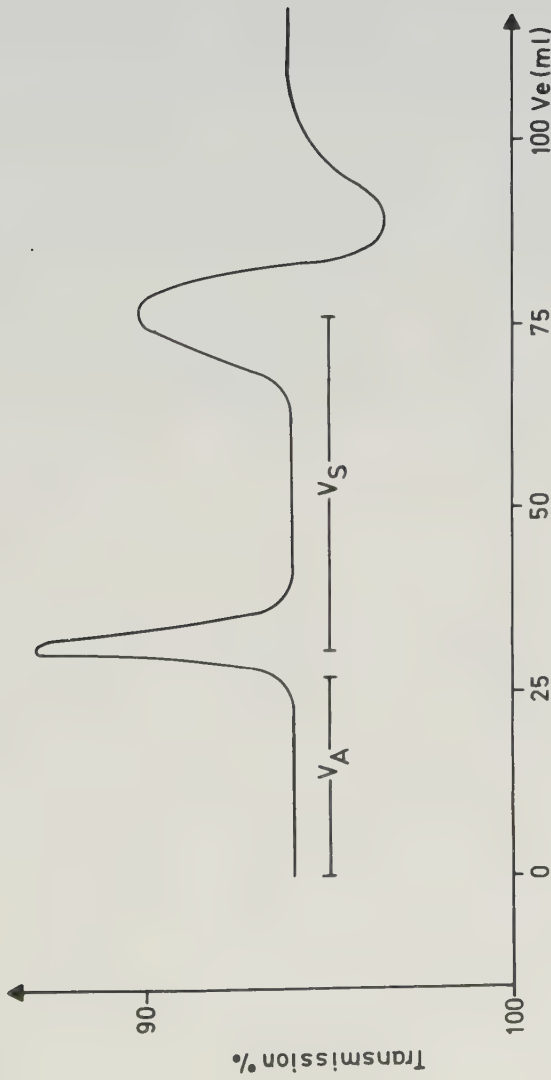


Abb. 4 Fraktionierung von Chromatin an Sephadex G 200 nach milder Nuclease -
Verdauung. Gelbett: 2 x 26,1 cm = 81,9 ml. Probevolumen: 3,0 ml.
Eluant: Tris-HCl 1 mM, Na-EDTA 2 mM, pH 7,6. Durchflußrate: 28,1 ml/Std.

a.c. Trennung an Sephadex G 150

Die Fraktionierung an Sephadex G 150 zeigt etwa die gleichen Verhältnisse wie die an G 200. Der erste Peak erscheint im Bereich $k_{av} = 0,02$ und das Maximum des zweiten Peaks ist bei $k_{av} = 0,8$. Das Tal liegt im Bereich von $k_{av} = 1,1$.

Tab. 5

Elutionsvolumina, k_{av} - und k_d -Werte UV-absorbierender Fraktionen von milde mit Nuclease verdaulichem Chromatin, getrennt an Sephadex G 150

Nr. der Fraktion	V_e (ml)	k_{av}	k_d
8	26,04	- 0,03	- 0,03
9	29,29	0,03	0,03
10	32,54	0,09	0,10
11	35,79	0,15	0,16
.			
.			
18	58,47	0,56	0,60
19	61,69	0,62	0,66
20	64,91	0,68	0,72
21	68,12	0,74	0,79
22	71,34	0,80	0,85
23	74,58	0,85	0,91
24	77,83	0,91	0,97
25	81,07	0,97	1,04
26	84,26	1,03	1,10
27	87,45	1,09	1,16
28	90,62	1,15	1,22
29	93,82	1,20	1,28
30	97,03	1,26	1,35

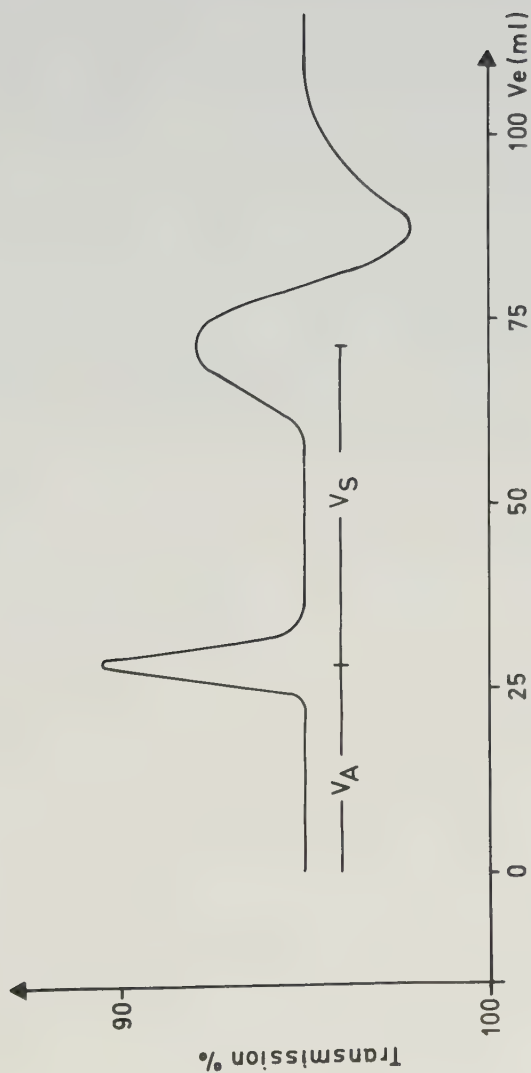


Abb. 5 Fraktionierung von Chromatin an Sephadex G 150 nach milder Nuclease -
Verdaunung. Gelbett: 2 x 26,3 cm = 82,6 ml. Probevolumen: 3,0 ml.
Eluant: Tris-HCl 1 mM, Na-EDTA 2 mM, pH 7,6. Durchflußrate: 18,5 ml/Std.

Die an Sepharose 4 B und an den Sephadextypen G 200 und G 150 durchgeführte gelchromatographische Auftrennung des Chromatins nach milder Verdauung mit Mikrokokken-Nuclease liefert zwei Fraktionen UV-absorbierender Substanzen. Jede der Fraktionen ist durch den k_d - bzw. k_{av} -Wert ihres Maximums charakterisiert, der für jeden Geltyp in Tab. 6 zusammengestellt ist.

Die Auftragung der Transmissionsminderung in Abhängigkeit vom k_{av} -Wert zeigt Abb. 6. Sie gestattet einen Vergleich des Kurvenverlaufs bei den einzelnen Trennmedien unabhängig von der Säulengeometrie.

Der erste Peak erscheint bei allen Trennmedien im Ausschlußvolumen, während die Lage der Kurve der verzögert eluierten Fraktion abhängig ist vom Geltyp. Bei den Sephadextypen wird diese verzögert eluierte Fraktion später eluiert als bei Sepharose.

Tab. 6

Zusammenstellung der ermittelten k_d - und k_{av} -Werte UV-absorbierender Fraktionen von milde mit Nuclease verdautem und gelchromatographisch getrenntem Chromatin

Trenn- medium	1. Peak		2. Peak	
	k_d	k_{av}	k_d	k_{av}
4 B	-	0,00	-	0,65
G 200	0,10	0,10	0,97	0,93
G 150	0,02	0,02	0,85	0,80

Auffällig bei allen Geltypen ist eine Talbildung, d.h. eine Senkung des Kurvenverlaufs unter die Nulllinie im Anschluß an den zweiten Gipfel. Diese Talbildung findet sich bei Sepharose im Bereich von $k_{av} = 0,9$ und bei den Sephadextypen im Bereich von $k_{av} = 1,1$.

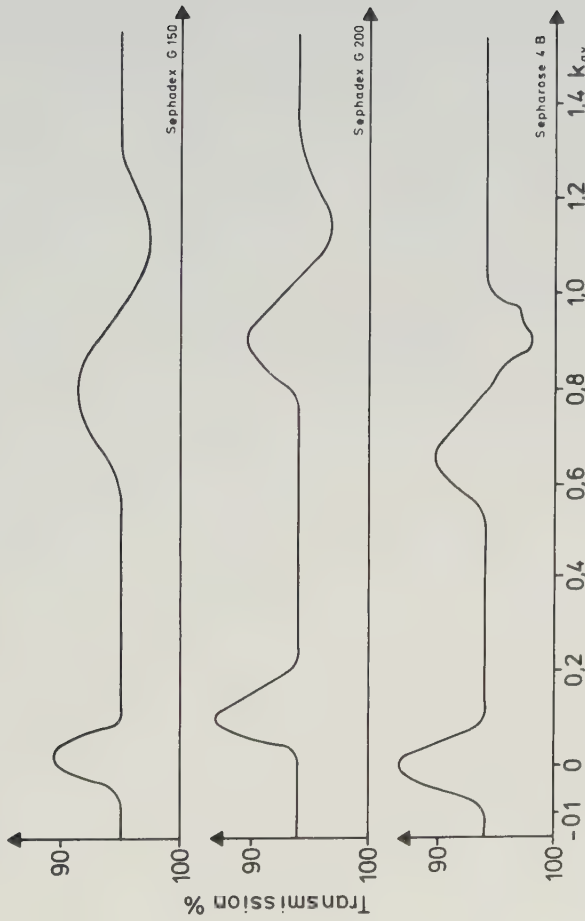


Abb. 6 Elutionsdiagramme von milde mit Nuclease verdaulichem Chromatin, fraktioniert an Sepharose 4 B (unten), Sephadex G 200 (mitte) und G 150 (oben). Die Auftragung der Transmissionsänderung in Abhängigkeit vom k_{av} -Wert erlaubt einen Vergleich der Elutionsmuster bei den verschiedenen Trennmedien.

3.b. Fraktionierung des Chromatins nach extensiver Verdauung mit Mikrokokken-Nuclease

Das in 1 mM Tris-HCl gequollene Chromatin wird bei 37°C 15 Min. Mikrokokken-Nuclease (50 E/ml) ausgesetzt und nach Enzyminaktivierung, Fixierung und Abzentrifugation des Niederschlages an Sepharose 4 B fraktioniert.

Elutionsmittel sind:

b.a. Tris-HCl	1 mM	
Na-EDTA	2 mM	pH 7,6
b.b. NaCl	100 mM	
Na-Citrat	50 mM	pH 7,6
b.c. H ₂ O (Aqua dest.)		

Das aufgetragene Probevolumen beträgt 3-5% des gesamten Säulenvolumens, die Durchflußrate zwischen 14,6 und 36,9 ml/Std.

zu b.a. Elutionsmittel: Tris-HCl 1 mM, Na-EDTA 2 mM, pH 7,6

Abb. 7 zeigt den Einfluß von extensiver Mikrokokken-Nuclease-Einwirkung auf das Elutionsprofil von Chromatin. Milde mit Nuclease verdautes Chromatin wird bei der Gelchromatographie in zwei Fraktionen UV-absorbierender Substanzen aufgetrennt. Nach extensiver Enzymeinwirkung erscheint mit Tris-HCl 1 mM, Na-EDTA 2 mM, pH 7,6, als Eluant nur noch ein symmetrischer Gipfel bei $k_{av} = 0,65$. Diesem Gipfel folgt ein zweiter flacherer, der durch eine Talbildung im Kurvenverlauf unterbrochen ist. Das Maximum der Talbildung liegt bei $k_{av} = 1,0$.

Tab. 7

Elutionsvolumina und k_{av} -Werte UV-absorbierender Fraktionen von extensiv mit Mikrokokken-Nuclease verdaulichem Chromatin, eluiert mit Tris-HCl 1 mM, Na-EDTA 2 mM, pH 7,6

Nr. der Fraktion	V_e (ml)	k_{av}
4	25,40	0,00
5	31,75	0,11
6	38,15	0,22
7	44,45	0,34
8	50,80	0,45
9	57,10	0,57
10	63,50	0,68
11	69,80	0,80
12	76,15	0,92
13	82,45	1,03
14	88,75	1,14
15	95,05	1,26
16	101,40	1,38

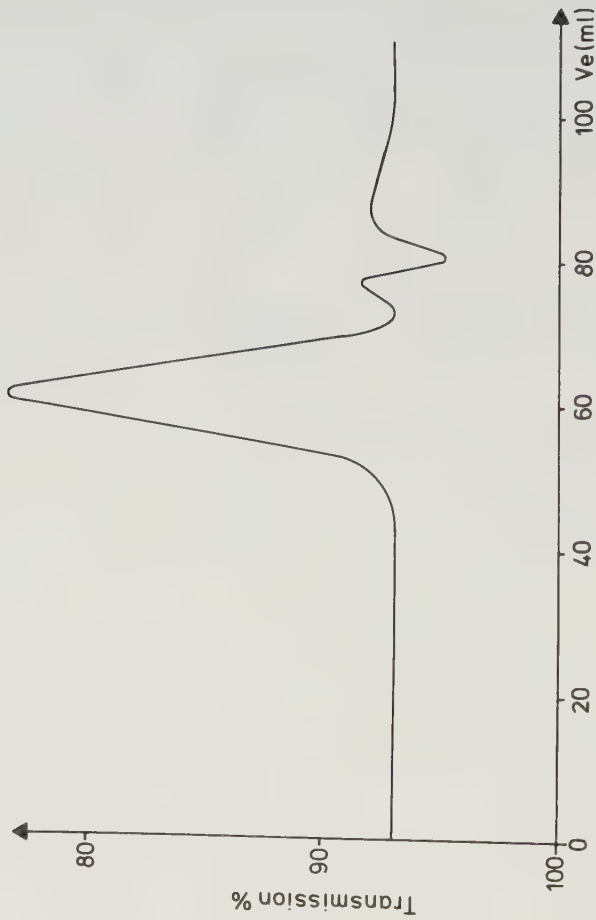


Abb. 7 Fraktionierung von Chromatin an Sepharose 4 B nach ausgedehnter Nuclease-Verdauung. Gelbett: 2 x 25,7 cm = 80,75 ml. Probevolumen: 3,0 ml. Eluant: Tris-HCl 1 mM, Na-EDTA 2 mM, pH 7,6. Durchflußrate 36,9 ml/Std.

zu b.b. Elutionsmittel: NaCl 100 mM, Na-Citrat 50 mM, pH 7,6
Eluiert man dagegen mit NaCl 0,1 M und Na-Citrat 0,5 M, pH 7,6, so erhält man eine doppelgipfelige Kurve. Das erste Maximum liegt bei $k_{av} = 0,92$, das zweite bei $k_{av} = 1,04$. Im aufgetragenen Probevolumen fehlt aber das Na-Citrat, so daß sein Fehlen für die innerhalb des Peaks auftretende Erhöhung der Transmission, d.h. für die verminderte Absorption des Eluates in diesem Bereich verantwortlich gemacht werden kann.
Das tatsächliche Maximum dürfte dann im Bereich von $k_{av} = 0,96$ liegen, und die Kurve wäre dann eingipfelig.

Tab. 8

Elutionsvolumina und k_{av} -Werte UV-absorbierender Fraktionen von extensiv mit Mikrokokken-Nuclease verdaulichem Chromatin, eluiert mit NaCl 0,1 M, Na-Citrat 0,05 M, pH 7,6

Nr. der Fraktion	V_e (ml)	k_{av}
14	15,4	0,86
15	16,5	0,95
16	17,6	1,04
17	18,7	1,14
18	19,8	1,23
19	20,9	1,32

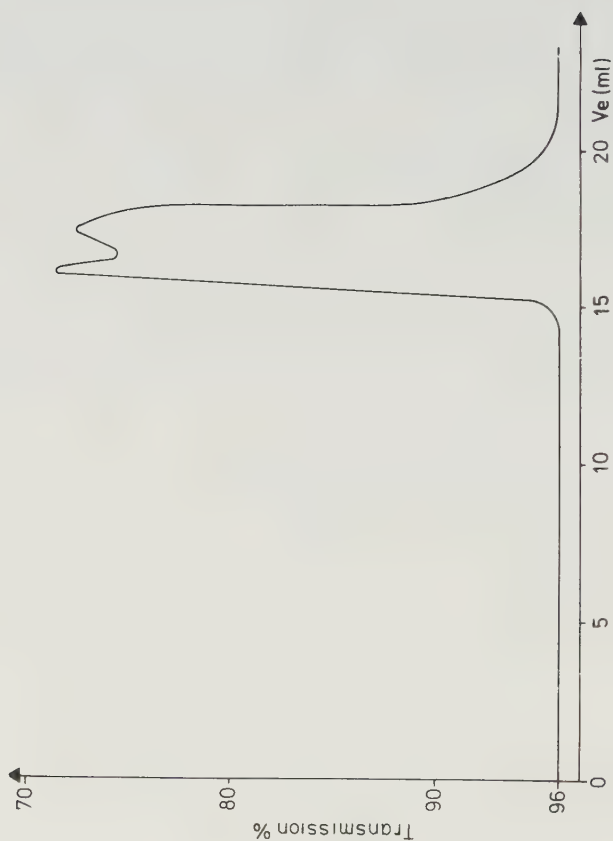


Abb. 8 Fraktionierung von Chromatin an Sepharose 4 B nach ausgedehnter Nuclease-Verdauung. Gelbett: $1 \times 21,7 \text{ cm} = 17,05 \text{ ml}$. Probevolumen: $1,0 \text{ ml}$. Eluant: $\text{NaCl } 0,1 \text{ M}$, $\text{Na-Citrat } 0,05 \text{ M}$, $\text{pH } 7,6$. Durchflußrate: $14,6 \text{ ml/Std.}$

zu b.c. Elutionsmittel: H_2O

Bei der Elution des gleichen Materials mit H_2O am gleichen Gel getrennt ergibt sich ein gänzlich anderer Kurvenverlauf. Man sieht hier (s. Abb. 9) eine breite rechtsschiefe Kurve mit Maximum bei $k_{av} = 0,1$ und einen zweiten kleineren Gipfel bei $k_{av} = 0,85$.

Tab. 9

Elutionsvolumina und k_{av} -Werte UV-absorbierender Fraktionen von extensiv mit Nuclease verdautem Chromatin, eluiert mit H_2O .

Nr. der Fraktion	V_e (ml)	k_{av}
4	25,6	0,00
5	32,0	0,12
6	38,4	0,24
7	44,8	0,36
8	51,2	0,48
9	57,6	0,59
10	64,0	0,71
11	70,4	0,83
12	76,8	0,95



Abb. 9 Fraktionierung von Chromatin an Sepharose 4 B nach ausgedehnter Nuclease-Verdauung. Gelbett: 2 x 25,3 cm = 79,5 ml. Probevolumen: 3,0 ml. Eluant: H₂O (Aqua dest.). Durchflußrate: 35,5 ml/Std.

Die dargestellten Elutionsdiagramme zeigen einmal den Einfluß der Nucleaseverdauung, zum anderen den der Ionenstärke der Elutionslösung auf das Trennverhalten.

Der Vergleich zwischen Abb. 3 und Abb. 7 zeigt, daß milde Verdauung des Chromatins mit Mikrokokken-Nuclease zwei Absorptionsmaxima liefert -eines bei $k_{av} = 0$ und eines bei $k_{av} = 0,65$ -, wenn man mit Tris-HCl 1 mM, Na-EDTA 2 mM, pH 7,6, eluiert. Dagegen erhält man unter gleichen Elutionsbedingungen nach extensiver Verdauung nur noch ein Absorptionsmaximum bei $k_{av} = 0,65$.

Abb. 10 zeigt die verschiedenen Elutionsdiagramme für jede Elutionslösung unabhängig von der Säulengeometrie. Vergleicht man die Lage der Absorptionsmaxima, so sieht man ihre Abhängigkeit von der Ionenstärke der Elutionslösung.

Tab. 10

Zusammenstellung der k_{av} -Werte der Monosomenpeaks in Abhängigkeit von der Ionenstärke des jeweiligen Elutionsmittels

	k_{av}
H ₂ O	0,10
NaEDTA 2 mM	0,65
NaCl 100 mM + Na-Citrat 50 mM	0,96

Die bei der gelchromatographischen Auftrennung des mit Mikrokokken-Nuclease verdauten Chromatins regelmäßig auftretende Talbildung im Anschluß an den Nucleosomenpeak läßt sich nur durch das Fehlen von EDTA in der aufgetragenen Probelösung erklären. Unverdautes Chromatin, das kein EDTA zur Enzyminaktivierung enthält, zeigt ebenso diese Talbildung im Bereich von $k_{av} = 1,0$ (s. Abb. 1). Da zur DNase-Inaktivierung jedoch EDTA am Ende der Inkubationszeit zugesetzt und die Säule mit EDTA-haltiger Elutionslösung äquilibriert wurde, muß das EDTA als unlösliches Ca-Salz zusammen mit den während der Nucleaseeinwirkung entstandenen Ausfällungen bei ihrer Abzentrifugation mit zu Boden sedimentiert sein und deshalb in der aufgetragenen Probe fehlen.

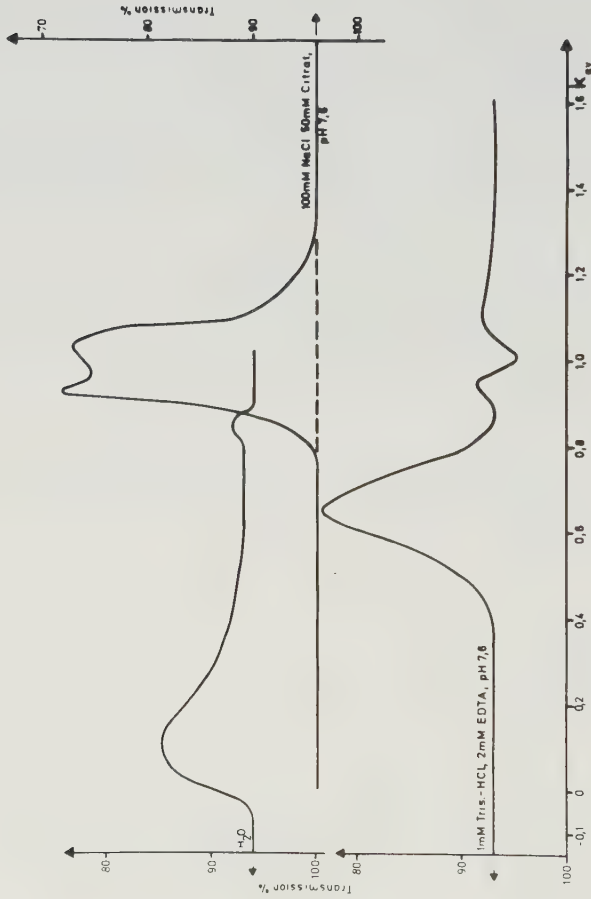


Abb. 10

Elutionsdiagramme von extensiv mit Nuclease verdautem Chromatin, fraktioniert an Sepharose 4 B. Eluant: Tris-HCl 1 mM, Na-EDTA 2 mM, pH 7,6 (unten); NaCl 0,1 M, Na-Citrat 0,05 M, pH 7,6 (mitte); H_2O (oben).

Die Auftragung der Transmissionsänderung in Abhängigkeit vom k_{av} -Wert zeigt den Einfluß der Ionenstärke des Eluents auf die Lage der Absorptionsmaxima.

V. Elektronenmikroskopie

Die nach Ultrabeschallung bzw. Partialabbau mit spezifischer DNase gelchromatographisch aufgetrennten Chromatinfractionen werden elektronenmikroskopisch untersucht. Die Proben werden nach Kontrastierung im Hell- oder Dunkelfeldverfahren dargestellt.

1. Elektronenmikroskopie des beschallten Kernmaterials

Das in 1 mM KCl gequollene und mit 1%igem Formaldehyd fixierte Kernmaterial wird ultrabeschallt. Die elektronenmikroskopische Abbildung dieses unfraktionierten Materials (Abb. 11) zeigt perlkettenartig strukturierte Chromatinfasern, die z.T. gestreckt, z.T. aber auch mehr oder minder geknäuelt verlaufen. Die Perlen liegen auf einigen Ketten eng nebeneinander, auf anderen weiter voneinander entfernt. Sie haben einen Durchmesser von 120-160 Å. Größere Strukturen entstehen durch Zusammenlagerung mehrerer Perlen. Dazwischen liegen einzeln verstreut monomere und auch oligomere Nucleosomen. Daneben sieht man nackte DNA-Fäden. (s. Abb. 11).

Das gleiche Material, an Sepharose 4 B fraktioniert, liefert isolierte Nucleosomen im absteigenden Teil der einzigen, im Ausschlußvolumen wandernden Fraktion. Bei den relativ stark verunreinigten Nucleosomen handelt es sich hauptsächlich um oligomere, aber auch monomere Verbindungen. Ihre Form und Struktur ist im Vergleich zu der von Nucleosomen enzymatisch gespaltenen Chromatins sehr unregelmäßig. Der Peak selbst enthält größere Agglomerate, dazwischen wenige monomere Partikel.



Abb. 11 Elektronenmikroskopische Aufnahme von unfractioniertem, beschalltem Chromatin. Gestreckt sowie geknäuelte verlaufende Chromatinfasern sind neben einzelnen Nucleosomen und Oligosomen zu sehen. Aber auch unterschiedlich lange, nackte DNA-Fäden sind über das gesamte Bild verteilt. Färbung durch Pt-Bedampfung. Vergrößerung: 25.000fach.

2. Elektronenmikroskopie des DNase-verdauten Chromatins
Gelchromatographie trennt Chromatin nach Partialabbau mit
Mikrokokken-Nuclease in zwei Fraktionen UV-absorbierenden
Materials.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der im Ausschluß-
volumen wandernden Fraktion zeigt neben einzelnen Nucleo-
somen hauptsächlich größere, unregelmäßig geformte Parti-
kel, die z.T. eine Zusammenballung aus mehreren Chromatin-
substrukturen erkennen lassen (s. Abb. 12).

Dagegen zeigt die zweite, verzögert eluierte Fraktion bei
allen verwendeten Geltypen fast ausschließlich isolierte
Nucleosomen, hauptsächlich monomere, aber auch di-, tri-
und tetramere Verbindungen. Die monomeren Chromatinsubstruk-
turen sind rund bis oval und haben einen Durchmesser von
120-130 Å.

Bei den Pt-bedampften Präparaten haben sie im Hellfeldver-
fahren ein leeres Zentrum; z.T. sind sie auch hufeisenför-
mig strukturiert (s. Abb. 13).

Im Dunkelfeldverfahren weisen die gleichen Strukturen einen
Durchmesser von etwa 130-160 Å auf. Größere Strukturen kom-
men durch Überlagerung zustande. (s. Abb. 14).



Abb. 12 Elektronenmikroskopische Aufnahme der nach Partialabbau mit Mikrokokken-Nuclease im Ausschlußvolumen wandernden Chromatinfraktion.

Zu sehen sind überwiegend größere Chromatinagglomerate, dazwischen aber auch typische Monosomen.

Färbung durch Pt-Bedampfung, Vergrößerung: 48.000fach.



Abb. 13 Elektronenmikroskopische Aufnahme der nach Partialabbau mit Mikrokokken-Nuclease verzögert eluierten Chromatinfraktion.

Dargestellt sind runde bis ovale, z.T. auch hufeisenförmige Partikel mit einem Durchmesser von 120 - 130 Å und einem leeren Zentrum. Zu sehen sind auch einige oligomere Partikel mit DNA-ähnlicher Verbindung. Färbung durch Pt-Bedampfung, Vergrößerung: 60.000fach.

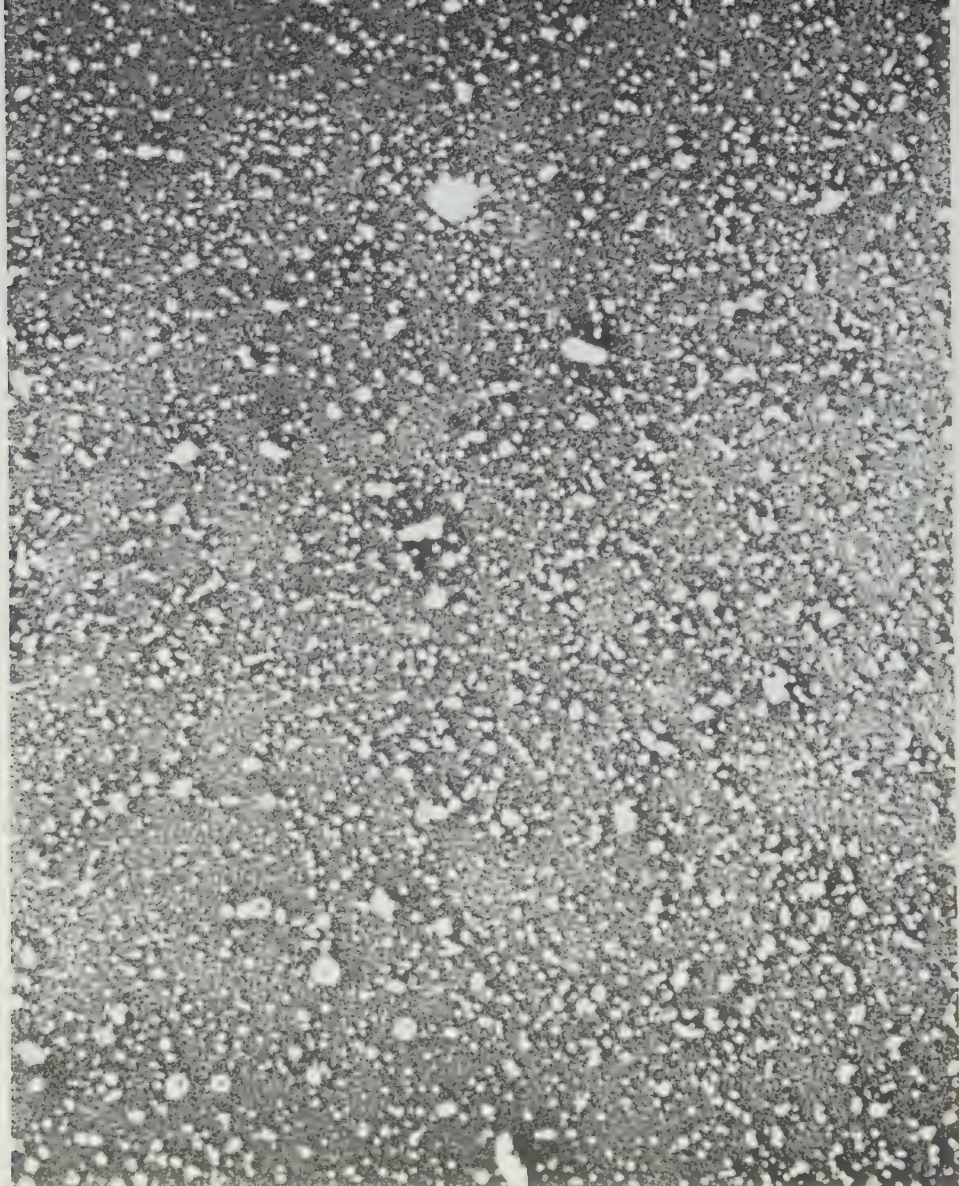


Abb. 14 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Nucleosomenfraktion wie in Abb. 13, hier jedoch im Dunkelfeldverfahren aufgenommen. Der Durchmesser der runden Partikel liegt zwischen 130 und 160 Å. Färbung durch Pt-Bedampfung, Vergrößerung: 48.000fach.

DISKUSSION

In dieser Arbeit wird zur Isolierung der Chromatinsubstrukturen als Trennmethode die Gelchromatographie angewandt. Es zeigen sich hierbei Unterschiede im Trennverhalten zwischen beschalltem und enzymatisch behandeltem Chromatin. Während beschalltes Chromatin bei seiner gelchromatographischen Auftrennung nur ein UV-Absorptionsmaximum zeigt, entstehen bei der Fraktionierung des mit Mikrokokken-Nuclease partiell abgebauten Chromatins zwei Maxima.

Monomere Nucleosomen finden sich im absteigenden, rechts-schiefen Teil der einzigen UV-absorbierenden Fraktion des beschallten Kernmaterials (s. Abb. 2), jedoch verunreinigt mit Polymeren dieser Substrukturen. Außerdem sieht man monomere Nucleosomen im zweiten, verzögert eluierten, symmetrischen Peak des milde mit Nuclease verdauten Chromatins (s. Abb. 3-5), hier jedoch zusammen mit wenigen oligomeren Nucleosomen (s. Abb. 13).

Auffällig ist, daß sich beschalltes Kernmaterial bei seiner Fraktionierung anders verhält als durch Nuclease verdautes, obgleich sowohl Beschallung als auch Nucleaseverdauung elektronenmikroskopisch nachweisbar Nucleosomen aus dem Chromatin freisetzen. Dies könnte mit der unterschiedlichen Zusammensetzung der Elutionslösungen erklärt werden: Beschalltes Kernmaterial wird mit KCl 1 mM, Formaldehyd 1% und Tris-HCl 5 mM eluiert, enzymatisch gespaltenes Chromatin mit Tris-HCl 1 mM, Na-EDTA 2 mM.

Eine andere, von verschiedenen Autoren angewandte Methode, vorbehandeltes Chromatin zu fraktionieren, ist die Sucrosegradientenzentrifugation.

Senior und Mitarbeiter (1975) fanden monomere Nucleosomen nach Sucrosegradientenzentrifugation von gequollenen und beschallten Kernen innerhalb des langsam sedimentierenden Anteils der einzigen UV-absorbierenden Fraktion. Der Peak selbst und der schnell sedimentierende Teil des Peaks enthalten Verunreinigungen durch Multimere dieser Monosomen.

Diese Befunde an beschalltem Chromatin stimmen überein mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit über beschalltes und gelchromatographisch fraktioniertes Chromatin. Dagegen zeigt die Sucrosegradientenzentrifugation des mit Nuclease verdauten Chromatins eine bessere Auftrennung gegenüber der Gelchromatographie. Fast zur gleichen Zeit konnten Noll (1974), Finch et al., (1975) und Bakayev et al. (1975) die Nucleosomenfraktion von enzymatisch gespaltenem Chromatin durch Sucrosegradientenzentrifugation aufspalten in Mono-, Di-, Tri- und Tetramere enthaltende Peaks. Dagegen enthält das gelchromatographisch fraktionierte Chromatin nur einen Nucleosomenpeak.

In Bezug auf den morphologischen Reinheitsgrad der Nucleosomenfraktion ist daher die Gradientenzentrifugation der hier angewandten Gelchromatographie überlegen.

Beschalltes Kernmaterial zeigt auch bei der Gradientenzentrifugation ein anderes Trennverhalten als Nuclease-verdautes Chromatin. Eine eventuell unzureichende Auftrennung des beschallten Materials im Dichtegradienten kann ausgeschlossen werden, da die Sucrosegradientenzentrifugation des beschallten Materials (Senior et al., 1975) unter gleichen Bedingungen wie die des partiell mit Mikrokokken-Nuclease abgebauten Chromatins erfolgte.

Dieses unterschiedliche Trennverhalten müßte also durch andersartige Eigenschaften des beschallten Chromatins selbst bedingt sein. Wenn dies so ist, dann ist die oben angeführte Verschiedenheit der Elutionslösungen bei der Gelchromatographie nicht der Grund für das unterschiedliche Trennverhalten.

Während unverdautes Chromatin bei Sepharose 4 B im Ausschlußvolumen wandert (Abb. 1), führt Partialabbau dieser Chromatinfraktion zur Verminderung (Abb. 3) und schließlich extensive Verdauung zum völligen Verschwinden der im Ausschlußvolumen wandernden, UV-absorbierenden Fraktion (Abb. 7). Gleichzeitig erscheint bei $k_{av} = 0,65$ die Nucleosomenfraktion als Verdauungsprodukt der Mikrokokken-Nuclease (Abb. 3 und 7). Dies zeigt, daß die durch den k_{av} -Wert Null charakterisierte Chromatinfraktion durch Partialabbau mit Mikro-

kokken-Nuclease in eine Chromatinfraction überführt werden kann, die durch $k_{av} = 0,65$ charakterisiert ist. Diesem k_{av} -Wert müßte dann ein bestimmtes Molekulargewicht zuzuordnen sein.

Das Molekulargewicht läßt sich aus Eichkurven ablesen, die den Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht einer Substanz und ihrem k_{av} -Wert wiedergeben. Aus einer solchen Eichkurve, aufgestellt an Sepharose 4 B für globuläre Proteine, ergibt sich für die bei $k_{av} = 0,65$ wandernde Nucleosomenfraction ein Molekulargewicht von weniger als 200.000 Daltons.

Bei Senior et al. (1975) wurde für die im Sucrosegradienten isolierten ν -bodies aus beschalltem Chromatin ein Molekulargewicht von 300.000 errechnet. Lacy und Axel (1975) fanden bei Nucleosomen, die durch DNase-Verdauung und anschließende Gradientenzentrifugation gewonnen wurden, ein Molekulargewicht von 240.000 allein für den Proteinanteil dieser Substrukturen. Sie fanden aber gleichzeitig, daß nur 60% des mit den Nucleosomen sedimentierenden Proteins aus Histonen besteht und nur H_1 gegenüber dem unverdauten Chromatin gering vermindert ist.

Auch wenn die Gelchromatographie diesen Nicht-Histonanteil und H_1 von den Nucleosomen trennen sollte, wäre das in der vorliegenden Arbeit gelchromatographisch ermittelte Molekulargewicht immer noch niedriger als das von Lacy und Axel (1975) ermittelte nach Abzug des Nicht-Histon- und H_1 -Anteils, das bei etwa 250.000 liegen dürfte.

Ebenfalls gegen das gelchromatographisch ermittelte Molekulargewicht spricht die Tatsache, daß in der bei $k_{av} = 0,65$ wandernden Nucleosomenfraction noch, wenn auch wenige, Oligomere elektronenmikroskopisch nachweisbar sind. Somit dürften bei Sepharose 4 B neben dem Molekulargewicht noch andere Effekte für das Trennverhalten der Nucleosomen verantwortlich sein.

Dies zeigt auch die Elution an den Sephadextypen G 200 und G 150. Das unverdaute Chromatin wird sowohl bei Sepharose 4 B als auch bei Sephadex im Ausschlußvolumen eluiert.

Dagegen erscheint der Nucleosomenpeak bei Sephadex erst bei k_{av} -Werten, die größer sind als der von Sepharose 4 B. Bei reiner Filtration, bei der nur das Molekulargewicht für den Trenneffekt verantwortlich ist, wären Werte kleiner als $k_{av} = 0,65$ zu erwarten. Tatsächlich aber liegen die Werte für G 200 bei etwa $k_{av} = 0,90$ und für G 150 bei etwa $k_{av} = 0,80$ (s. Abb. und Tab. 6).

Da man von einem Molekulargewicht von 250.000 für Monosomen ausgehen muß, müßte bei beiden Sephadextypen die Nucleosomenfraktion im Ausschlußvolumen und bei Sepharose 4 B bei $k_{av} = 0,50 - 0,60$ zu erwarten sein.

Die bei der Gelchromatographie beobachtete Retardierung von Substanzen wird als "reversible Adsorption" bezeichnet. Es werden dafür Coulomb'sche oder van der Waals'sche Kräfte zwischen Substanz und Gelphase verantwortlich gemacht (Determann, 1967). Bekannt ist die Retardierung von heterozyklischen und aromatischen Verbindungen sowie von geladenen Substanzen an Sephadex (Gelotte, 1960). Bei der gelchromatographischen Trennung der beiden Chromatinfractionen dürften solche Wechselwirkungen eine Rolle spielen, die bei Sepharose sehr viel weniger ausgeprägt sind als bei den Sephadextypen. Daß sie bei Sepharose ebenfalls mitbeteiligt sind, wird deutlich, wenn man die Lage des Nucleosomenpeaks in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Elutionslösung betrachtet (s. Abb. und Tab. 10). Bei der Elution mit H_2O wird die Nucleosomenfraktion bereits bei $k_{av} = 0,1$ eluiert, erscheint also früher im Vergleich zur Elution bei niedriger Ionenstärke (Na-EDTA 2 mM). Bei Steigerung der Ionenstärke (NaCl 0,1 M, Na-Citrat 0,05 M als Eluanten) nimmt die Retardierung der Nucleosomenfraktion dagegen noch zu. Porath (1960) hatte bei der systematischen Untersuchung von Aminosäuren, Peptiden und kleinen Proteinen festgestellt, daß bei Sephadex neben der Filtration noch andere Kräfte wirksam werden, die stark von der Zusammensetzung des Elutionsmittels abhängen. Ebenso bei Dextrangelen ist ein Ausschluß von Säuren beschrieben, wenn sie mit destilliertem Wasser eluiert werden (Determann und Gelotte, 1964).

Die im Ausschlußvolumen wandernde Fraktion zeigt keine Retardierung. Sie enthält unverdautes Chromatin, das sich im Elektronenmikroskop als multimere Agglomerate der Nucleosomen darstellen läßt. Folglich sind hier also die chemischen Strukturen oder Ladungsträger, die mit der Gelmatrix in Wechselwirkung treten könnten, maskiert. Durch den Partialabbau mit Mikrokokken-Nuclease müßten diese Strukturen -wenigstens zum Teil- demaskiert werden.

Während des Partialabbaus des Chromatins durch Nuclease entstehen im Inkubat Niederschläge. Bei diesen Niederschlägen dürfte es sich um Nicht-Histonproteine handeln, die während der Aufarbeitung des Chromatins, vor allem während der DNase-Einwirkung, vom Chromatin dissoziieren und als unlösliche Aggregate präzipitieren (Augenlicht und Lipkin, 1976).

Denkbar ist, daß so eine Demaskierung am Verdauungsprodukt zustande kommt, was dann zu den beschriebenen Wechselwirkungen führen dürfte.

Ebenso wäre es auch möglich, daß die Affinität des Histon-typs H_1 zu den Nucleosomen nach Partialabbau des Chromatins durch Mikrokokken-Nuclease vermindert ist, und so die DNA an der Oberfläche der Nucleosomen mit der Gelmatrix in Wechselwirkung treten kann. Bakayev und Mitarbeiter (1975) untersuchten die Proteinzusammensetzung von Originalchromatin und von im Sucrosegradienten isolierten Chromatinfractionen nach Mikrokokken-Nuclease-Einwirkung. Sie fanden eine nur halb so große Menge H_1 -Histon in der Nucleosomenfraktion verglichen mit dem H_1 -Gehalt im Originalchromatin und in den Tri- und Oligosomenfraktionen. Ebenso waren Nicht-Histonproteine in der Monosomenfraktion nicht nachweisbar, während im gelösten Chromatin nach Nucleaseverdauung ebenso wie in der Oligosomenfraktion eine geringe, aber signifikante Menge von Nicht-Histonproteinen vorhanden war.

Die Tatsache, daß in der gelchromatographisch isolierten Nucleosomenfraktion auch Oligosomen zu finden sind, muß nicht im Widerspruch stehen zur Annahme, daß H_1 -Histon und die Nicht-Histonproteine Einfluß auf die gelchromato-

graphische Trennung haben und evtl. in der gelchromatographisch isolierten Nucleosomenfraktion fehlen. Da diese Proteine zumindest teilweise für den Zusammenhalt der Chromatinsubstrukturen in einer übergeordneten Chromatinstruktur verantwortlich sind, müßten die Oligosomen, die mit H_1 und Nicht-Histonproteinen assoziiert sind, im Ausschlußvolumen wandern. Die Oligosomen aber ohne diesen Proteinanteil müßten in der Nucleosomenfraktion isoliert werden. Tatsächlich zeigen die elektronenmikroskopischen Aufnahmen agglomerierte Oligosomen in der im Ausschlußvolumen wandernden Chromatinfraktion und überwiegend kettenförmig angeordnete Oligosomen in der Nucleosomenfraktion.

Bakayev et al. (1975) beschrieben im unfraktionierten Nuclease-verdauten Chromatin zwei Arten von Chromatinfasern, die sich im Ausmaß ihrer Streckung unterscheiden. Bei den dicht gepackten Chromatinfasern liegen die Partikel eng aneinander, und DNA-ähnliche Verbindungen zwischen benachbarten ν -bodies sind nicht zu sehen. Dieser Fasertyp hat die Tendenz zur Bildung von zweidimensionalen Windungen. Dagegen zeigen die langgestreckten Chromatinfasern alternierend Nucleosomen und unterschiedlich lange, DNA-ähnliche Verbindungsstücke.

Dies stimmt überein mit den Befunden der vorliegenden Arbeit. Auch hier sieht man im unfraktionierten, beschallten (s. Abb. 11) oder Nuclease-verdauten Chromatin mehr oder weniger gestreckte Ketten mit den oben angegebenen Eigenschaften. Im gelchromatographisch fraktionierten Chromatin finden sich in der im Ausschlußvolumen wandernden Fraktion hauptsächlich größere, elektronendichte Partikel, die z.T. Agglomerate von Chromatinsubstrukturen erkennen lassen (s. Abb. 12). Gestreckte Chromatinfasern sind nur selten zu sehen.

Dagegen enthält die Nucleosomenfraktion des Nuclease-verdauten Chromatins neben den isolierten Nucleosomen auch oligomere Partikel, die überwiegend gestreckt sind und eine DNA-ähnliche Verbindung zeigen (s. Abb. 13).

Finch et al. (1975) zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen von im Sucrosegradienten isolierten Mono- und Oligosomen. Die Oligosomen liegen hier gewöhnlich dicht zusammen oder bilden Agglomerate, gelegentlich sind sie etwas weiter voneinander entfernt, verbunden durch dünne Fasern. Diese Agglomerationsneigung der im Sucrosegradienten isolierten Oligomere dürfte bedingt sein durch die Cosedimentation von H_1 und Nicht-Histonproteinen. Dagegen zeigen die Oligosomen aus der Nucleosomenfraktion des gelchromatographisch getrennten Chromatins überwiegend einen gestreckten Verlauf, während agglomerierte Oligosomen nur in der im Ausschlußvolumen wandernden Fraktion enthalten sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die Gelchromatographie im Gegensatz zur Gradientenzentrifugation zwar nicht imstande ist, die Nucleosomenfraktion in Mono- und Oligosomen zu diskriminieren. Die Befunde lassen aber vermuten, daß die Gelchromatographie im Verhältnis zur Gradientenzentrifugation bezüglich der stofflichen Zusammensetzung reinere Nucleosomen liefert, die frei von anderen Chromatinbestandteilen sind, insbesondere von H_1 und Nicht-Histonen.

Nach Bestätigung dieser Befunde durch Untersuchung der Proteinzusammensetzung der gelchromatographisch isolierten Fraktionen von Nuclease-verdaulichem Chromatin, wäre die Gelchromatographie eine geeignete Methode zur weiteren Untersuchung der Substrukturen und vor allem der Mechanismen, die an der Transcription beteiligt sind.

Damit wäre es möglich, dem Zusammenhang zwischen Chromatinstruktur und den genetischen Regulationsmechanismen in der eukaryotischen Zelle näherzukommen.

ZUSAMMENFASSUNG

Interphasezellkerne werden isoliert und das Chromatin wird durch Quellen in stark hypotoner Lösung freigesetzt. Dieses Chromatin wird entweder mit Ultraschallwellen behandelt oder durch Mikrokokken-Nuclease partiell abgebaut, das Reaktionsprodukt gelchromatographisch fraktioniert und die UV-Absorption der einzelnen Fraktionen als Maß ihres DNA-Gehaltes registriert. Die DNA-haltigen Fraktionen werden elektronenmikroskopisch untersucht.

Beschalltes Chromatin liefert bei seiner gelchromatographischen Auftrennung an Sepharose 4 B einen Peak im Ausschlußvolumen. Im absteigenden Teil dieses Peaks finden sich Nucleosomen als mono- und oligomere Verbindungen, jedoch stark verunreinigt mit größeren Agglomeraten.

Dagegen zeigt die gelchromatographische Auftrennung von Chromatin, das mit Mikrokokken-Nuclease partiell abgebaut wurde, zwei Fraktionen: eine, die im Ausschlußvolumen wandert, und eine, die verzögert eluiert wird. Diese verzögert eluierte Chromatinfraktion enthält ausschließlich Nucleosomen als mono- und oligomere Verbindungen. Die im Ausschlußvolumen wandernde Fraktion enthält multimere Agglomerate, läßt sich aber durch extensive Verdauung mit Mikrokokken-Nuclease vollständig in die Nucleosomenfraktion überführen.

Die Nucleosomenfraktion ist durch ihren k_{av} -Wert charakterisiert. Er liegt bei Sepharose 4 B im Bereich von 0,65, bei Sephadex G 200 um 0,90 und bei Sephadex G 150 bei etwa 0,80. Diese Werte zeigen, daß zumindest bei den Sephadextypen eine Retardierung der Nucleosomenfraktion erfolgt. Für eine Wechselwirkung zwischen der Nucleosomenfraktion und der Gelmatrix von Sepharose 4 B spricht die unterschiedliche Lage des Nucleosomenpeaks in Abhängigkeit von der Ionenstärke der Elutionslösung. Mit H_2O eluiert, erscheint die Nucleosomenfraktion bereits bei $k_{av} = 0,1$, während die Elution mit NaCl 100 mM, Na-Citrat 50 mM den Nucleosomenpeak erst bei einem k_{av} -Wert von etwa 1,0 erscheinen läßt.

LITERATURVERZEICHNIS

Augenlicht, L.H. and M. Lipkin

Chromatin Monomer: Absence of Non-Histone Proteins

Bioch.Biophys.Res.Commun. 70, 540-544 (1976)

Bakayev, V.V.; Melnickov, A.A.; Osicka, V.D.; Varshavsky, A.J.

Studies on chromatin: II. Isolation and characterization of chromatin subunits

Nucleic Acids Res. 2, 1401-1419 (1975)

Baldwin, J.P.; Boseley, P.G.; Bradbury, E.M.

The subunit structure of the eukaryotic chromosome

Nature 253, 245-249 (1975)

Burgoyne, L.A.; Hewisch, D.R.; Mobbs, J.

Mammalian Chromatin Substructure Studies with the Calcium-Magnesium Endonuclease and Two-Dimensional Polyacrylamide-Gel Electrophoresis

Biochem.J. 143, 67-72 (1974)

Determann, H.

Gelchromatographie

Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1967)

Determann, H. und B. Gelotte

Gelfiltration

In: Biochemisches Taschenbuch II, 905-912

Herausgeber: Prof. Dr. H.M. Rauen, 2. Auflage, Springer-Verlag (1964)

DuPraw, E.J.

The Organisation of Nuclei and Chromosomes in Honeybee Embryonic Cells

Proc.Nat.Acad.Sci. USA 53, 161-168 (1965)

Finch, J.; Noll, M.; Kornberg, R.D.

Electron microscopy of defined lengths of chromatin

Proc.Nat.Acad.Sci. USA 72, 3320-3322 (1975)

Gelotte, B.

Studies on Gel Filtration. Sorption Properties of the Bed
Material Sephadex

J.Chromatog. 3, 330-342 (1960)

Gottesfeld, J.M.; Murphy, R.F.; Bonner, J.

Structure of transcriptionally active chromatin

Proc.Nat.Acad.Sci. USA 72, 4404-4408 (1975)

Kornberg, R.D. and J.O.Thomas

Chromatin Structure: Oligomers of the Histones

Science 184, 865-868 (1974)

Kornberg, R.D.

Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA

Science 184, 868-871 (1974)

Lacy, Elizabeth and R. Axel

Analysis of DNA of isolated chromatin subunits

Proc.Nat.Acad.Sci. USA 72, 3978-3982 (1975)

Lewin, B.

The nucleosome: subunit of mammalian chromatin

Nature 254, 651-653 (1975)

McGuire, W.L. and B.W. O'Malley

Ribonucleic acid polymerase activity of the chick oviduct
during steroid-induced synthesis of a specific protein

Biochim.Biophys.Acta 157, 187-194 (1968)

Noll, M.

Subunit structure of chromatin

Nature 251, 249-251 (1974)

Noll, M.

Internal structure of the chromatin subunit

Nucleic Acids Res. 1, 1573-1578 (1974b)

Olins, Ada L. and D.E. Olins

Spheroid Chromatin Units (v Bodies)

Science 183, 330-332 (1974)

Oudet, P.; Gross-Bellard, M.; Chambon, P.

Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit

Cell 4, 281-300 (1975)

Porath, J.

Gel Filtration of Proteins, Peptides and Amino Acids

Biochim.Biophys.Acta 39, 193-207 (1960)

Solari, A.J.

The Molecular Organization of the Chromatin Fiber

In: The Cell Nucleus, Volume I, 493-535

Ed. Busch, H., Academic Press, New York and London (1974)

Senior, Marylin B.; Olins Ada L.; Olins, D.E.

Chromatin Fragments Resembling ν Bodies

Science 187, 173-175 (1975)

Sollner-Webb, Barbara and G. Felsenfeld

A Comparison of Digestion of Nuclei and Chromatin by Staphylococcal Nuclease

Biochemistry 14, 2915-2920 (1975)

Varshavsky, A.J. and V.V. Bakayev

Studies on Chromatin: III. ν -Bodies and Free DNA in Chromatin Lacking Histone H 1

Mol.Biol. Reports 2, 209-217 (1975)

Varshavsky, A.J. and V.V. Bakayev

Studies on Chromatin: IV. Evidence for a Toroidal Shape of Chromatin Subunits

Mol.Biol. Reports 2, 247-254 (1975 b)

Whitlock, J.P., Jr. and R.T. Simpson

Removal of Histone H 1 Exposes a Fifty Base Pair DNA Segment between Nucleosomes

Biochemistry 15, 3307-3314 (1976)

Wolfe, S.L.

The fine structure of isolated chromosomes

J.Ultrastruct.Res. 12, 104-112 (1965)

LEBENS LAUF

Am 13.9.1948 wurde ich, Franz Josef Spira, als Sohn der Eheleute Clementine und Johann Josef Spira geboren.

Nach achtjährigem Besuch der Katholischen Bekenntnisschule in Bingen-Büdesheim absolvierte ich von 1963-1966 eine Verwaltungslehre beim Landratsamt in Bingen. Anschließend besuchte ich die Kaufmännische Berufsaufbauschule in Mainz, wo ich 1967 die Fachschulreife erwarb. 1968 trat ich in das Ketteler Kolleg in Mainz ein -altsprachlicher Zweig- und legte dort im September 1970 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1970/71 begann ich das Medizinstudium an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz. Hier bestand ich das Vorphysikum 1971, das Physikum 1973 und die Ärztliche Prüfung am 14.7.1977.

Als Medizinalassistent war ich in der Chirurgischen und Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses in Groß-Gerau und in der Neurologischen Klinik der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz tätig. Am 1.9.1978 erhielt ich meine Approbation als Arzt.

Seit 1.10.1978 arbeite ich am Pharmakologischen Institut in Mainz.

Seit 26.2.1971 bin ich mit Gaby Spira, geb. Zimmerschitt, verheiratet; am 5.3.1976 wurde unser Sohn Johannes geboren.

Herrn Prof. Dr. R. K. Zahn danke ich herzlich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit sowie für seine wissenschaftlichen Anregungen. Ebenso gilt mein Dank Frau Pondeljak für die Erstellung der elektronenmikroskopischen Bilder und Herrn Beyer für seine tatkräftige Unterstützung und Beratung.

